

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS SCHICKSAL
POLYVALENTER TRYPSIN – KALLIKREIN
INHIBITOREN IM ORGANISMUS
DER RATTE

DIETER A. MECKL

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut an
der Chirurgischen Klinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Dr. phil. E. Werle

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS SCHICKSAL POLYVALENTER
TRYPSIN - KALLIKREIN INHIBITOREN IM ORGANISMUS
DER RATTE

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung
der
Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dieter A. Meckl
aus Rosenheim

1969

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Werle
Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H. Fritz
Dekan: Prof. Dr. E. Kraft

Tag der mündlichen Prüfung: 16.6.1970



MEINER MUTTER UND MEINEM VERSTORBENEN STIEFVATER
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

I N H A L T

VERWENDETE ABKURZUNGEN	1
A EINLEITUNG	2
B THEORETISCHER TEIL	4
Chemische Eigenschaften des Trasylol	4
Pharmakologisches Verhalten	5
Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten von Trasylol	6
C EIGENE UNTERSUCHUNGEN	10
I. Messmethoden	10
1. Messung der Trypsinhemmung	10
2. Messung der Kallikreinhemmung	11
3. Messung der Plasminhemmung	13
a) photometrische Bestimmung	13
b) Astrup - Plattentest	13
c) visueller Fibrinolysetest	14
4. Methodik der pharmakologischen Versuche	14
a) Injektion der Inhibitoren	14
b) Herstellung der Extraktproben	15
5. Zusatz	16
II. Untersuchung des nach Injektion in den Nieren der Ratte gespeicherten Trasylol	17
1. Inkubationsversuche mit Trasylol	17
2. Molekulargewichtsbestimmung des in den Nieren gespeicherten Trasylol	19

3. Verhältnis von "hochmolekularer" zu "niedermolekularer" Trasylolfraktion: Abhängigkeit von der Verweildauer in den Nieren und vom pH-Wert	23
4. Hemmverhältnisse (Enzymaktivitäten)	27
5. Plasminhemmung	28
6. Inkubationsversuche mit "niedermole- kularer Nieren-Trasylolfraktion" in Nierenhomogenat	31
7. Verhältnis von "hochmol." zu "nieder- mol." Trasylol: Abhängigkeit von der Inkubationszeit	32
8. Die Aminosäurezusammensetzung des "niedermolekularen Nieren-Trasylol" und Amino-Endgruppenbestimmung	34
DISKUSSION	37
ZUSAMMENFASSUNG	44
LITERATURVERZEICHNIS	46
III. Verteilung eines neuen, Trasylol-ähnlichen Proteinaseinhibitors nach i.v. Injektion im Organismus der Ratte im Vergleich mit Trasylol	50
1. Chemische Eigenschaften des Inhibitors	50
2. Verteilung nach i.v. Injektion auf ver- schiedene Organe	52
DISKUSSION	60
ZUSAMMENFASSUNG	65
LITERATURVERZEICHNIS	66

IV. Feinreinigung von technischem Trasylol mit Hilfe eines wasserunlöslichen Trypsin-Harzes	67
1. Prinzip	67
2. Herstellung des Trypsin-Harzes	67
3. Feinreinigung	69
4. Dialyse mit acetylierten Dialyse- schläuchen	70
5. Spezifische Aktivität und Amino- säureanalyse	72
ZUSAMMENFASSUNG	73
LITERATURVERZEICHNIS	74

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

ADH	Alkoholdehydrogenase
BAEE	Benzoyl-arginin-ethylester
BAPA	Benzoyl-arginin-p-nitroanilid
ImU	Inhibitormillieinheit
KE	Kallikreineinheit
KIE	Kallikreininhibitoreinheit
mE	Enzymmillieinheit
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
Tra	Triäthanolamin

E I N L E I T U N G

Bereits 1930 entdeckten KRAUT, FREY und WERLE in Parotis, Milz, Leber und Lymphknoten des Rindes einen Inhibitor für Kallikrein^(4,20). Kallikreine sind hochspezifische, in vielen Körperflüssigkeiten und Organen vorkommende Proteinasen⁽³⁷⁾, die aus höhermolekularen Eiweißstoffen die pharmakologisch hochaktiven Kinine freisetzen können⁽⁴²⁾. 1936 beschrieben KUNITZ und NORTHROP⁽²³⁾ die Isolierung eines Trypsininhibitors aus Rinderpankreas.

WERLE erkannte später, daß der Trypsininhibitor aus Pankreas auch Kallikreine hemmt, und der Kallikreininhibitor auch eine Hemmung von Trypsin und Chymotrypsin verursacht^(34,38). Heute wissen wir, daß beide Inhibitoren auch in ihrer Aminosäuresequenz identisch sind⁽³⁾.

Dieser Proteinaseinhibitor, der von den Farbenfabriken Bayer aus Rinderlunge isoliert und unter dem Namen Trasylol vertrieben wird, besitzt das breiteste Hemmspektrum von allen bisher bekannten Inhibitoren:

Er hemmt die Enzyme

Kallikrein,

Plasmin,

Trypsin und

Chymotrypsin, sowie an der Plasminogenaktivierung

beteiligte Vorstufen. Daneben wirkt er auch

antithromboplastisch.

Daraus resultiert bei der therapeutischen Anwendung sein breiter Wirkungsbereich für folgende Krankheitsbilder, die durch die Fermente des Kinin-, des Gerinnungs- und des Lysissystems bestimmt werden:

Akute Pankreatitis,

Schock,

Primäre und sekundäre
Hyperfibrinolyse,

Gerinnungsstörungen und

Störungen im Wundheilungsverlauf.

Aus bisherigen Untersuchungen geht übereinstimmend hervor, daß nur durch eine Dauertropfinfusion im strömenden Blut ein über einen längeren Zeitraum (Stunden) nachweisbarer Inhibitorspiegel aufrecht erhalten werden kann, denn die Eliminierung des Inhibitors aus dem Blut erfolgt rasch, wobei er selektiv in den Nieren angereichert wird, ohne daß der Inhibitor im Harn erscheint^(1,19,40).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden,

1. warum der Inhibitor selektiv in den Nieren gespeichert wird,
2. warum keine Ausscheidung in den Harn erfolgt,
3. ob der Inhibitor im Organismus chemischen Veränderungen unterliegt und wenn ja, welcher Natur diese Veränderungen sind.

Infolge der zu erwartenden Schwierigkeiten und Zeitdauer der Untersuchungen wurde die Arbeit innerhalb eines Arbeitsteams (vgl. Dissertation von K.H. Oppitz, B.M. Kemkes und H. Schult) durchgeführt.

T H E O R E T I S C H E R T E I L

I. Chemische Eigenschaften des Trasylol

Als Trasylol bezeichnen wir den polyvalenten Proteinaseinhibitor aus Rinderorganen, dessen Aminosäuresequenz von LASKOWSKI und Mitarb. bzw. von ANDERER⁽³⁾ bestimmt wurde:

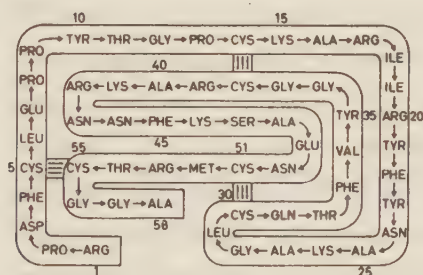


Abb. 1.

Das basische Polypeptid ist aus 58 Aminosäuren zusammengesetzt und besitzt ein Molekulargewicht⁽²¹⁾ von 6513. Der isoelektrische Punkt liegt bei 10,5 .

Durch schwache Säuren und Temperaturen bis 60° C läßt sich der Inhibitor nicht zerstören. Pepsin und die Proteinasen des Pankreas greifen ihn - im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinaseinhibitoren - nicht an. In eiweißfällenden Reagentien (Trichloressigsäure, 70% Äthanol mit Eisessig, Perchlorsäure) bleibt er gelöst. Eine partielle Denaturierung erfolgt durch Harnstoffzusatz. Diese Denaturierung ist reversibel⁽³⁵⁾.

Mit den Enzymen Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein und Plasmin bildet Trasylol in physiologischen pH-Bereichen einen Komplex im jeweiligen Molverhältnis von 1:1.



Die Komplexbildung ist in allen Fällen reversibel; beim Ansäuern verschiebt sich das Gleichgewicht wieder zu Gunsten der Einzelkomponenten. Die Dissociationskonstanten der Komplexe liegen zwischen 10^{-8} (Kallikrein-Trasylol) und 10^{-12} (Trypsin-Trasylol).

Die Komplexbildung erfolgt bei Zusammenbringen der Einzelkomponenten nicht momentan, sondern erfordert je nach dem Hemmgrad einige Sekunden bis einige Minuten bis zur Erreichung des Hemmgleichgewichts. Deshalb soll bei der Messung immer eine Vorinkubationszeit von 5 Minuten eingehalten werden.

II. Pharmakologisches Verhalten

Nach intravenöser Injektion von Trasylol befindet sich fast die gesamte Inhibitormenge im Blutplasma; in den Erythrozyten sind nur Spuren davon. Der Trasylolgehalt im Plasma sinkt jedoch schnell ab^(1,18,40).

Nach intravenöser Injektion von 3000 ImU bei der Ratte sind nach 3 Minuten nur noch 20% der gesamten injizierten Inhibitormenge im Blut zu finden, 30 Minuten nach der Injektion nur noch ca. 4%⁽¹⁹⁾. Mit dem raschen Abfall im Blut geht ein zeitlich verzögerter, starker Anstieg

der InhibitorKonzentration in den Nieren einher, sodaß 1 Stunde post injektionem bereits 60% des gesamten Inhibitors in den Nieren zu finden sind⁽¹⁹⁾. Unterbindet man bei Mäusen die Nierengefäße, so wird der Abfall des Trasylolspiegels im Blut verzögert^(1,18).

Im ersten 24-Stunden-Urin von mit Trasylol behandelten Patienten befindet sich noch kein Inhibitor⁽⁴¹⁾. Er wird wahrscheinlich innerhalb einer Woche größtenteils in inaktiven Bruchstücken im Harn ausgeschieden, wie dies Tierversuche mit radioaktiv markiertem Trasylol zeigten⁽³⁵⁾.

III. Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten von Trasylol

Nach Gewebsschädigungen irgend einer Art wird, je nach Schweregrad des Traumas, der Stoffwechsel der Zellen derartig gestört und vermindert, daß ein Absinken des pH im Gewebe resultiert (Anreicherung von Milchsäure?). Dadurch werden aktive proteolytische Enzyme aus den Lysosomen frei, die in den Kreislauf geraten können und hier proteolytische Vorgänge im Plasma auslösen wie z.B. die Plasminogenaktivierung oder die Überführung von Plasmapräkallikrein in aktives Plasmakallikrein, das dann seine peripher gefäßerweiternde und blutdrucksenkende Wirkung ausübt und so zu einem lebensbedrohlichen Kreislaufkollaps führen kann⁽⁴²⁾. Kallikreine setzen aus Kininogen Kinin frei, das durch seine kapillarpermeabi-

lilitätserhöhende Wirkung die Ödembildung und das Schockgeschehen einleitet (Abb. 2)⁽⁴²⁾.

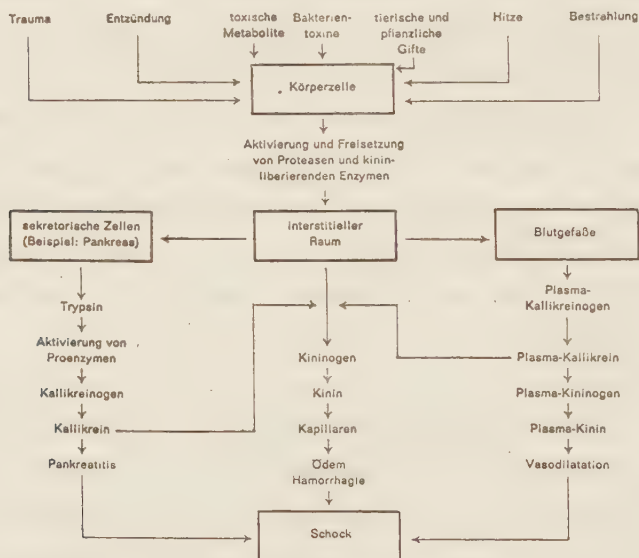


Abb. 2, Freisetzung von Kininen unter pathologischen Bedingungen.

Zur Behandlung der akuten Pankreatitis wurde Trasylol im Jahre 1953 zum ersten Mal von FREY in die Klinik eingeführt. Aus praktischer Erfahrung und Beobachtung ergaben sich zahlreiche neue Anwendungsmöglichkeiten. Die Entdeckung weiterer durch Trasylol hemmbarer Proteinasen und ihrer Beziehung zu bestimmten Krankheiten führte zu weiteren therapeutischen Konsequenzen⁽¹⁴⁾:

1. Akute Pankreatitis^(9,10,11,13,27,33)

Das Trasylol hat hierbei folgende therapeutische Effekte:

- a) Es erfolgt eine partielle Hemmung der zur Aktivierung des proteolytischen Systems führenden Reaktionen.
 - b) Eine Ödemausbreitung und Stase im Pankreas wird durch die Hemmung lokal aktivierter Kininogenasen verhindert.
 - c) Trasylol hemmt das durch die in die Blutbahn gelangte Ödemflüssigkeit aktivierte Serumkallikrein. Damit wird das ausgelöste und unterhaltene Schockgeschehen unterbunden.
 - d) Unter dem Einfluß von Trasylol kommt es zur Verminderung der Sekretionsrate und der Enzymsekretion des Pankreas⁽³²⁾.
2. Ebenfalls wird Trasylol bei hyperfibrinolytischen Zuständen angewendet, da sich die Hemmspezifität auch auf das Plasmin erstreckt^(17,24,25,30).
 3. Trasylol wird auch zur Behandlung mechanisch oder thermisch bedingter Gewebstraumen herangezogen. Es verhindert die proteolytische Aktivität und den Blutdruckabfall^(24,33).
 4. Bei extrem hoher Dosierung soll das Trasylol zu einer Hemmung des Thrombinsystems führen; also eine Thrombenbildung verhindern helfen^(2,33).
 5. Bei schweren abdominellen Infektionen können die dabei auftretenden Schocksymptome günstig beeinflusst werden⁽²⁸⁾.
 6. Eine gesteigerte Fibrinolyse in Kombination mit einer

Fibrinogenopenie halten mehrere Untersucher für die Ursache postoperativer Blutungen nach Eingriffen mit extrakorporalem Kreislauf. Deshalb wird auch hier eine antifibrinolytische Therapie mit Trasylol angestrebt.

E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

I. Messmethoden für die Enzymbestimmungen

1. Messung der Trypsinhemmung

Prinzip: Man läßt nebeneinander Trypsin (Bezugswert) und Trypsin mit Inhibitorlösung (Hemmansatz) auf BAPA als Substrat einwirken. Bei der nun eintretenden Amidspaltung macht sich das freigesetzte Nitroanilid durch Gelbfärbung bemerkbar. Die Intensität der Farbe wird photometrisch bestimmt. Ihre Zunahme ist proportional zur Trypsinaktivität.

Reagentien:

- A) Trypsin: 5 mg Rindertrypsin (Trypure Novo^K, Calcium stabilisiert) werden in 100 ml Aqua bidest. oder 0,002N Salzsäure gelöst und bei 0-4° C aufbewahrt.
- B) 0,2M Tra-Puffer pH 7,8
- C) BAPA: 100 mg BAPA (Fluka) werden in 100 ml Aqua bid. im kochenden Wasserbad gelöst.

Ansätze:

In die Küvetten werden 3 ml Ansätze einpipetiert:

- 1. Bezugswert: 0,2 ml Trypsinlösung (A) + 1,8 ml Tra-Puffer (B).
 - 2. Hemmansatz: 0,2 ml Trypsinlösung (A) + bis zu 0,5 ml Inhibitorlösung + Tra-Puffer (B) auf 2 ml aufgefüllt.
- Beide Ansätze werden bei 25° C 5 Minuten inkubiert. Dann gibt man zu jedem Ansatz 1 ml BAPA-Lösung (C) hinzu und

mißt bei einer Wellenlänge von 405 nm die Extinktionsänderung pro Minute insgesamt 5 Minuten lang.

Berechnung:

Eine Enzymmillieinheit (mE) entspricht bei diesem Test einer Extinktionsdifferenz von $\Delta E = 0,00332$ pro Minute⁽³⁵⁾. Man subtrahiert die Extinktionsänderung pro Minute des Hemmansatzes von der Extinktionsänderung pro Minute des Bezugswertes und errechnet die in der Testprobe enthaltenen ImU mit der Formel:

$$\text{ImU/Probe} = \frac{\Delta E_{\text{Bez.}} - \Delta E_{\text{Hemm.}}}{0,00332}$$

Sind über 70% des vorgelegten Trypsins gehemmt, so muß man die Messung mit einer größeren Verdünnung der Inhibitorlösung wiederholen, da jenseits von 70% die Hemmung nicht mehr proportional der Inhibitorkonzentration ist⁽³⁵⁾.

2. Photometrische Bestimmung der Kallikreinhemmung

Prinzip: Man läßt Kallikrein (Bezugswert) und Kallikrein mit Inhibitorlösung (Hemmansatz) auf BAEE als Substrat einwirken und bestimmt das bei der Spaltung von BAEE freiwerdende Äthanol mit Hilfe des optischen Tests. Der Alkohol wird mit ADH dehydriert, und dabei NAD^+ zu NADH_2 reduziert, dessen Extinktion photometrisch gemessen wird⁽³⁶⁾.

Reagentien:

- A) 0,067N Pyrophosphatpuffer: 15,2 g Natriumpyrophosphat, 4,1 g Semicarbacid, 0,9 g Glycin werden in 500 ml

Aqua bidest. gelöst und mit 2N Natronlauge auf pH 8,7 eingestellt.

- B) Nicht standartisiertes Kallikrein: z.B. eine Ampulle Padutin zu 10 KE in 10 ml 0,1M Tra-Puffer pH 7,8 gelöst.
- C) BAEE - Lösung
- D) ADH (30 mg Protein/ml) (Boeringer)
- E) NAD^+ : 20 mg DPN (Boeringer) werden in 1 ml Pyrophosphatpuffer gelöst.

Ansätze:

In die Küvetten werden 3 ml Ansätze einpipetiert:

1. Leerwert: 0,1 ml NAD^+ (E) + 2,38 ml Puffer (A) + 0,5 ml BAEE (C) + 0,02 ml ADH (D)
2. Vergleichswert: 0,1 ml NAD^+ (E) + 2,28 ml Puffer (A) + 0,5 ml BAEE (C) + 0,02 ml ADH (D)
3. Hemmansatz: 0,1 ml NAD^+ (E) + 1,98 ml Puffer (A) + 0,5 ml BAEE (C) + 0,02 ml ADH (D)

Die Ansätze werden 5 min. bei 25° C inkubiert. Daneben inkubiert man 0,1 ml Kallikreinlösung (B) mit bis zu 0,3 ml Inhibitorlösung 5 min. bei 25° C. Zum Bezugswert (= Vergleichswert) kommen dann 0,1 ml Kallikreinlösung (B) und zum Hemmansatz die vorinkubierte Kallikrein-Inhibitorlösung. Nach 2 minütigem Warten werden die Extinktionen am Photometer bei 366 nm gemessen. Hierbei stellt man den Leerwert auf E=0 ein. Nach genau 10 Minuten wird der Leerwert wieder auf E=0 eingestellt und die Extinktionen nochmals abgelesen.

Berechnung:

Bei diesem Test entspricht eine Extinktionsdifferenz von $E = 0,0011$ pro Minute einer $mE^{(35)}$. Die in der Testprobe enthaltenen ImU errechnen sich nach der Formel:

$$\text{ImU/Probe} = \frac{\Delta E_{\text{Bezugswert}} - \Delta E_{\text{Hemm.}}}{0,0011}$$

Sind über 70% des vorgelegten Kallikreins gehemmt, so muß man die Messung mit einer größeren Verdünnung der Inhibitorlösung wiederholen, da jenseits von 70% die Hemmung nicht mehr proportional der Inhibitorkonzentration ist⁽³⁵⁾.

3. Messung der Plasminhemmung

a) Photometrische Bestimmung

Prinzip: Plasmin spaltet BAPA und BAEE⁽³⁵⁾.

Durchführung: Der photometrische Test läßt sich in der gleichen Weise durchführen wie die Messung der Trypsinhemmung im BAPA-Test und der Kallikreinhemmung im BAEE-Test.

b) Astrup - Plattentest

Diese Testmethode für die Plasminhemmung ist unter C II, 5 beschrieben.

c) Fibrinolysetest

Prinzip: An einem Gerinnsel wird unter Anwesenheit des Proteinaseinhibitors die Plasminaktivierung mit Streptokinase eingeleitet. Man mißt die Zeit bis zur

Auflösung des Gerinnsels. Hierbei erfaßt man auch den Angriff des Inhibitors an den Plasminvorstufen.

Reagentien:

1. Citratblut: 1 ml Sol. Natr. citric. 3,8% wird mit Venenblut in einer Spritze auf 10 ml aufgezogen.
2. Test - Thrombin (Behringwerke)
3. Streptokinase (Streptase, Behringwerke)
4. Physiol. Kochsalzlösung

Versuchsbeschreibung:

In einem Uhlenhutröhrchen im Thermostaten von 37° C werden 0,3 ml physiol. Kochsalzlösung bzw. Testlösung, 0,8 ml Citratblut, 0,1 ml Streptase (20 I.E.) und 0,1 ml Thrombin (1 NIH-E) einpipetiert und die Zeit bis zur Wiederauflösung des entstandenen Gerinnsels gemessen (Gerinnungszeit + Lysiszeit).

4. Methodik der pharmakologischen Versuche (zu C III)

Injektion der Inhibitoren und Gewinnung von Blut, Organen und Harn: Albinoratten wurden nach dem Wiegen möglichst konzentrierte Inhibitorlösungen (in physiologischer Kochsalzlösung ca. 0,5-1,0 ml) in die Schwanzvene injiziert. Nach den in den Tabellen angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere durch Dekapitation entblutet, die Organe exstirpiert und sofort eingefroren (-20°) oder aufgearbeitet. Bei den Tieren, die 24 Std. nach der Injektion getötet wurden, wurde der in dieser Zeit ausgeschiedene Urin gesammelt.

Herstellung der Extraktproben: Das beim Zentrifugieren des Blutes gewonnene Serum wurde mit demselben Volumen 6proz. Perchlorsäure (Endkonzentration 3%) versetzt. Der beim Ansäuern ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert, die saure Lösung mit 5M K_2CO_3 -Lösung neutralisiert und das unlösliche Kaliumperchlorat nach kurzem Stehen der Proben bei 0° abzentrifugiert. Der neutrale Überstand wurde zur Bestimmung der Inhibitorkonzentration verwendet.

Die Organe bzw. Teile davon wurden nach Zugabe von 1 ml dest. Wasser und 2 ml 6proz. Perchlorsäure pro g Gewebe unter Kühlung (0-4°) homogenisiert (Ultra-Turrax, Janke u. Kunkel, 20 000 U/Min. und Ultraschallgerät, Branson Sonic Power, U.S.A.). Die unlöslichen Gewebsbestandteile wurden abzentrifugiert, der Überstand mit 5M K_2CO_3 neutralisiert, das ausgefallene Kaliumperchlorat abzentrifugiert und die neutralen Extrakte zum Trypsinhemmtest eingesetzt. Pankreasextrakte wurden vor dem Neutralisieren zur vollständigen Zerstörung des Trypsinogens für 5 Min. auf 60° C erhitzt.

Bestimmung des Inhibitorgehaltes: Die Bestimmung der Inhibitorkonzentration im Harn erfolgte ohne weitere Vorbehandlung, da sie sich durch Enteiweißen des Harns nicht veränderte. Die Verdünnung bei den Organextrakten wurde durch Multiplikation der gefundenen Inhibitormengen mit dem Verdünnungsfaktor (Serum: 2, Organe: 4) berücksichtigt. Zur Berechnung der Inhibitormenge im Blut wurden folgende Faktoren verwendet: 6,7 ml Blut entsprechen 3,7 ml Serum pro 100 g Körpergewicht bei Ratten.

5. Zusatz

Zu allen Tierversuchen wurden männliche Albinoratten mit einem Gewicht zwischen 280 g und 310 g verwendet.

Trasylo^R, BAYER Leverkusen, die Ampulle zu 100 000 KIE in 10 ml wurde zur Injektion und als Vergleichswert bei Hemmversuchen benützt.

Wenn von enteiweißten Inhibitorfraktionen die Rede ist, wurden mit 5% iger Perchlorsäure im Volumenverhältnis 1 : 1 die höhermolekularen Proteine denaturiert und abzentrifugiert.

Als gereinigt wird der Inhibitor bezeichnet, der mit Hilfe von wasserunlöslichem Trypsin-Harz von Begleit-substanzen gesäubert wurde (siehe C IV).

Als "hochmolekulares Nieren-Trasylo^R" und "niedermolekulares Nieren-Trasylo^R" werden die hochmolekulare und die niedermolekulare Inhibitorfraktion bezeichnet, die beide durch Sephadex-Gelfiltration aus dem Überstand eines ultrazentrifugierten Nierenhomogenates von Ratten, denen Trasylo^R injiziert worden war, gewonnen wurden.

II. Untersuchung des nach Injektion in den Nieren der Ratte gespeicherten Trasylol

1. Inkubationsversuche mit Trasylol^R in Nierenhomogenaten

Um zu sehen ob Trasylol in der Niere enzymatisch abgebaut wird und an Aktivität verliert, wurden Inkubationsversuche mit Trasylol in Nierenhomogenaten ausgeführt.

Die Nieren von zwei Ratten wurden im Gewichtsverhältnis 1:2 mit Tra-Puffer, pH 7,3, homogenisiert, und das Homogenat 30 Minuten bei 50 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Den klaren Überstand trennte man vom Niederschlag und teilte beide in zwei gleiche Teile, wobei der Niederschlag mit physiologischer Kochsalzlösung auf das gleiche Volumen, wie es der Überstand hatte, aufgegossen wurde. Jede der vier Portionen versetzte man nun mit 250 ImU Trasylol^R pro ml Lösung und inkubierte sie, wie aus den Tabellen ersichtlich, verschiedene Zeiten lang bei 37° C und bei 0° C als Vergleichswert.

Tabelle 1 und 2 (siehe nächste Seite): Es wurden drei Versuche mit je zwei Ratten gemacht. Die Niederschlags-suspension wurde nach der Inkubation wieder ultrazentrifugiert und der Überstand davon im BAPA-Test auf Inhibitoraktivität getestet. Der dritte Versuch wurde nurmehr mit der Niederschlagssuspension bei 0° C Inkubationstemperatur durchgeführt.

Tabelle 1:

ÜBERSTAND (gerührt)

Inkubations- zeit	Temperatur °C	eingesetzt pro ml (ImU)	gefunden pro ml (ImU)
30 min.	0°	250	286
4 Std.	37°	250	297
15 min.	0°	250	286
1 Std.	37°	250	260

Ein enzymatischer Abbau des Trasylol findet weder in der Niederschlagssuspension noch im klaren Überstand des ultrazentrifugierten Nierenhomogenates statt. Dagegen ist eine starke Aktivitätsminderung im Niederschlag des Homogenats bei einer Inkubationstemperatur von 0° C zu finden.

Tabelle 2:

NIEDERSCHLAG (gerührt)

Inkubations- zeit	Temperatur °C	eingesetzt pro ml (ImU)	gefunden pro ml (ImU)
30 min.	0°	250	34,6
4 Std.	37°	250	256
15 min.	0°	250	36,5
1 Std.	37°	250	260
1 Std.	0°	250	66,0

2. Molekulargewichtsbestimmung des in den Nieren der Ratte gespeicherten Trasylol

Die Sephadex-Gelfiltration ermöglicht die Trennung von Substanzen auf Grund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße und damit auch ihres Molekulargewichtes⁽⁵⁾.

Für Moleküle, die in die Käfige der Polydextranstruktur diffundieren können, besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes und ihrem Elutionsvolumen⁽¹²⁾.

Versuchsdurchführung:

Einer Ratte, der in die Schwanzvene 3000 ImU Trasylol^R injiziert worden waren und die 4 Stunden nach der Injektion getötet wurde, entfernte man die Nieren und homogenisierte diese in 0,1N Tra-Puffer pH 7,3. Das Homogenat wurde anschließend bei 50 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand abgegossen und mit obigem Tra-Puffer auf 8 ml aufgefüllt.

Diese 8 ml Nierenextrakt wurden auf eine mit Sephadex G-50 gefüllte Säule (80x3 cm) aufgetragen. Wir ließen 0,1N Tra-Puffer, pH 7,3, mit konstantem Druck durch eine Trampelpumpe nachlaufen.

Das Eluat leiteten wir durch ein Durchflußphotometer (photometrische Registrierung durch Absorptionsmessung bei 260 nm), das an einen Extinktionsschreiber mit konstantem Papiervorschub angeschlossen war. Anschließend wurden die gleich aufgeteilten Fraktionen auf ihre Trypsin Hemmwirkung getestet und die Elutionsvolumina bis zum

Maximum der Aktivität hin gemessen.

Danach wurde auf die gleiche Säule ein Proteingemisch aus vier Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht aufgetragen:

1. 20 mg γ -Globulin vom Rind (Behringwerke),
MG: 150 000
2. 10 mg Cymotrypsinogen (Worthington), MG: 24 000
3. 5 mg Cytochrom c (Boeringer), MG: 12 000
4. Die Substanzen 1-3 wurden in einer Ampulle Trasylol^R zu 5 ml (25 000 KIE) gelöst, MG des Trasylol: 6 500

Anhand der Kurve, die der Extinktionsschreiber lieferte, konnten die Elutionsvolumina der einzelnen Proteine mit bekanntem Molekulargewicht ermittelt werden. Die Errechnung der unbekannten Molekulargewichte geschieht mit folgender Eichkurve: Auf der Ordinate sind die Molekulargewichte im logarithmischen Maßstab eingetragen, die Verhältnisse aus den Elutionsvolumina V der Proteinmaxima und dem Leervolumen V_0 der Säule auf der Abszisse.

(Abbildung 3 und 4, nächste Seite)

Das unbekannte Molekulargewicht des in der Niere gespeicherten Trasylol konnte nun durch das gefundene Verhältnis $V_{\text{Nieren-Trasylol}}$ zu V_0 aus der Eichkurve bestimmt werden.

(Tabelle 3, übernächste Seite)

Abbildung 3

Extinktionskurven eines Proteingemisches
bei Gelfiltration



1 Globulin

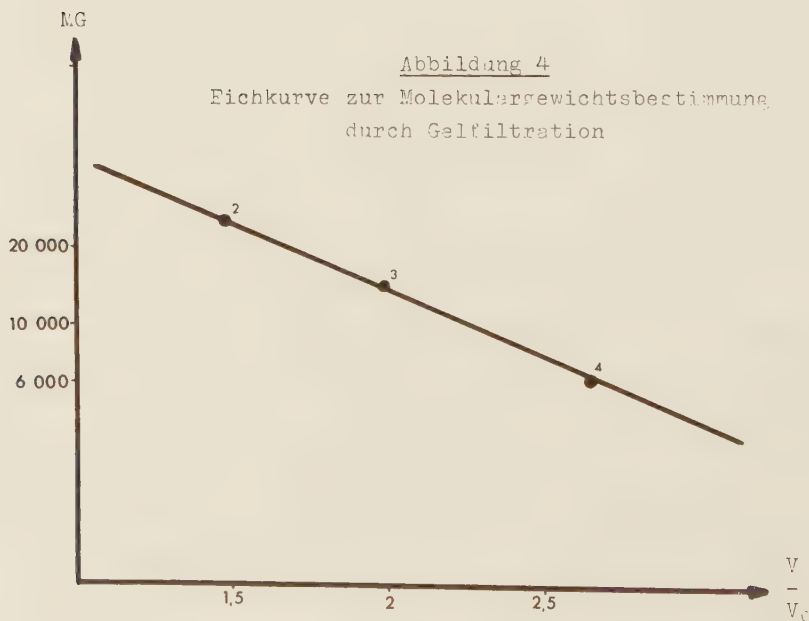
2 Chymotrypsinogen

3 Cytochrom c

4 Trasylol

Abbildung 4

Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung
durch Gelfiltration



Ergebnis:

Protein	V (ml)	V/V_0	M.G.
γ - Globulin	190,6(V_0)	1,000	150 000
Chymotrypsinogen A	281,5	1,476	25 000
Cytochrom c	379,1	1,990	12 000
Trasylol	508,7	2,660	6 500
hochmol. Fraktion	243,3	1,276	31 500
niedermol. Fraktion	528,9	2,770	5 500

Tabelle 3: I = bekannte Molekulargewichte
II = bestimmte Molekulargewichte

Wie aus der Tabelle 3 hervorgeht, erschien das in den Nieren der Ratte gespeicherte Trasylol im Eluat in zwei Fraktionen unterschiedlichen Molekulargewichts: einer hochmolekularen (MG bei 31 500) und einer niedermolekularen (MG bei 5 500) Form.

Die Annahme, daß es sich bei der hochmolekularen Inhibitorfraktion um Trasylol handelt, das an einen höhermolekularen Stoff assoziiert oder gebunden sein muß, konnte durch folgende Untersuchungen bekräftigt werden:

1. Hochmolekulare Eiweißstoffe werden im allgemeinen durch Behandlung mit 3% iger Perchlorsäure zerstört. Beim Enteiweißen der hochmolekularen Inhibitorfraktion traten jedoch keine Verluste an Inhibitoraktivität (gemessen im BAPA-Test) auf. Es kann sich also nicht um einen

hochmolekularen Inhibitor handeln.

2. In den 8 ml Nierenhomogenat befanden sich von den 3 000 der Ratte injizierten ImU Trasylol insgesamt 2 570 ImU. Die niedermolekulare Fraktion enthielt davon 2 230 ImU. Die hochmolekulare 340 ImU.

In den Nieren einer Ratte befinden sich im Durchschnitt jedoch nur bis zu 60 ImU an körpereigenem Inhibitor⁽¹⁹⁾. Die 340 ImU der hochmolekularen Fraktion müssen also ein Teil des injizierten Trasylol sein.

3. Verhältnis der hochmolekularen zur niedermolekularen Inhibitorfraktion in Abhängigkeit von der Verweildauer des Trasylol in den Nieren

8 Ratten wurden in die Schwanzvene je 5 000 ImU Trasylol injiziert. In bestimmten Zeitabständen (30 min., 4 Std., 12 Std., 24 Std.) post injektionem wurden die Tiere getötet und die Nieren entnommen. Diese wurden wieder wie oben (C II, 2) beschrieben homogenisiert, das Homogenat ultrazentrifugiert, und der klare Überstand auf eine mit Sephadex G-50 gefüllte Säule gegeben.

Im Eluat erschien das Trasylol wieder in allen Fällen in zwei Fraktionen von verschiedener Molekülgröße (siehe C II, 2).

Der jeweilige Inhibitorgehalt des Überstands der Nierenhomogenate und das Verhältnis der hochmolekularen zu der niedermolekularen Fraktion sind aus den Tabellen 4 und 5 und der Abbildung 5 ersichtlich.

Tabelle 4

Zeit post inject.	aufgetr. auf Sephadex G-50	Fraktion hochmol.	Fraktion nieder- mol	Verhältnis hoch- : nieder- mol mol
30 min.	1300	330	970	1 : 2,9
30 min.	1130	300	830	1 : 2,8
4 Std.	1910	300	1650	1 : 5,5
4 Std.	2420	370	2050	1 : 5,5
12 Std.	3750	230	3520	1 : 15,3
12 Std.	3470	440	3030	1 : 6,9
24 Std.	4250	250	4000	1 : 16,0
24 Std.	3980	270	3710	1 : 13,7

Im Durchschnitt und in Prozent ausgedrückt

ergibt sich:

30 min.	100 %	25,8 %	74,2 %	1 : 2,9
4 Std.	100 %	15,2 %	84,8 %	1 : 5,5
12 Std.	100 %	2,5 %	97,5 %	1 : 11,1
24 Std.	100 %	2,4 %	97,6 %	1 : 14,9

Tabelle 5

hochmol. : niedermol.

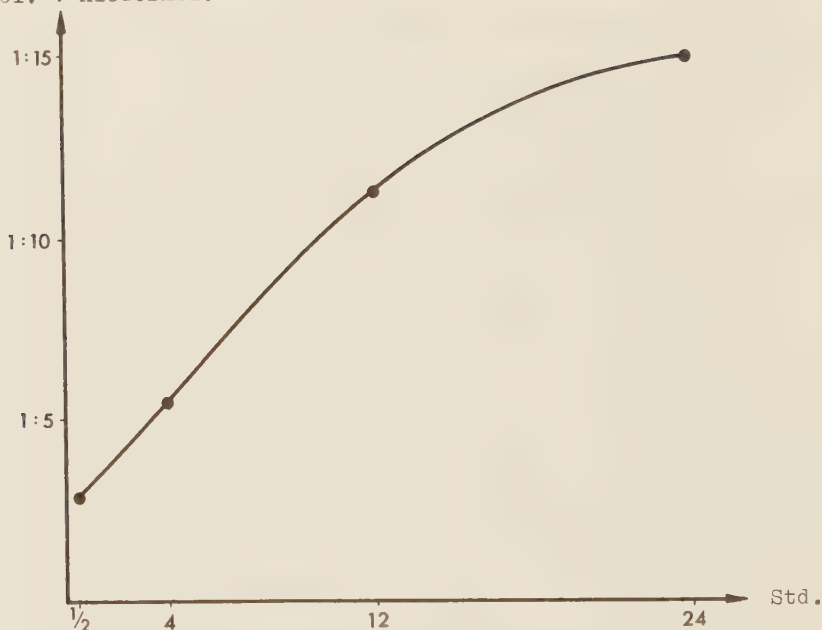


Abbildung 5: Ordinate: Verhältnis der hochmol. zur niedermol. Inhibitorfraktion. Abszisse: Verweildauer des injizierten Trasylol in den Nieren.

Mit zunehmender Speicherdauer des injizierten Trasylol in den Nieren der Ratte verschiebt sich das Verhältnis der bei der Gelfiltration gewonnenen hochmolekularen Inhibitorfraktion zur niedermolekularen Fraktion zu Gunsten der niedermolekularen.

Bei der Herabsetzung des pH-Wertes in den Nierenhomogenaten von pH 7,3 zum Säuren beobachteten wir ebenfalls eine Verschiebung des Verhältnisses von hochmolekularer Inhibitorfraktion zu niedermolekularer Fraktion zu Gunsten

der niedermolekularen:

pH Puffer	Fraktion hochmol.	Fraktion niederm.	Verhältnis hoch- : nieder mol : mol
7,3	15,2 %	84,8 %	1 : 5,5
6,5	12,3 %	87,7 %	1 : 7,1
4,3	7,5 %	92,5 %	1 : 12,3

Tabelle 6: Zu diesen Versuchen wurden den Ratten vier Stunden nach der Injektion von 5000 ImU Trasylol die Nieren entnommen. Zum Homogenisieren und zur Gelfiltration wurden als Puffer pH 7,3 und pH 6,5 0,1M Tra-, für pH 4,3 0,1M Trinatriumcitrat-Puffer verwendet.

hochmol. : niedermol.

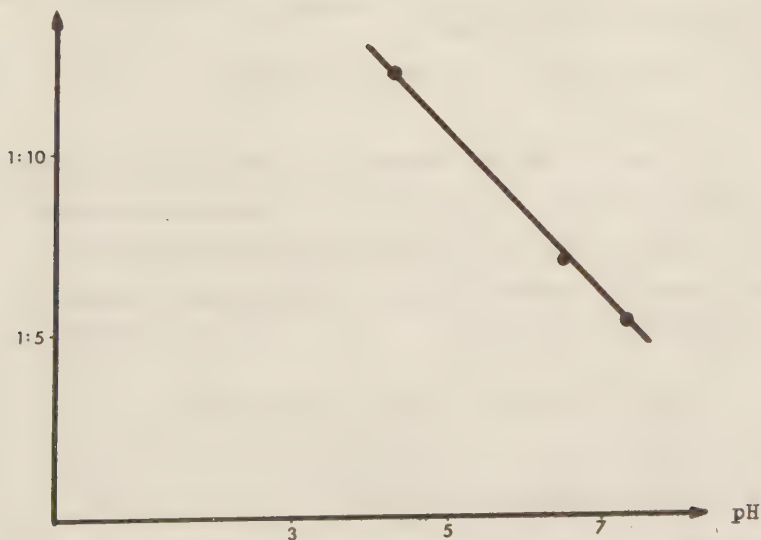


Abb. 6: Ordinate: Verhältnis des Inhibitorgehalts der hochmol. zu dem der niedermol. Fraktion. Abszisse: pH-Werte der zum Homogenisieren u. zur Gelfiltration verwendeten Puffer.

4. Das Hemmverhältnis für Trypsin und Kallikrein

Die bei der Sephadex-Gelfiltration erhaltene hoch- und niedermolekulare Inhibitorfraktion untersuchten wir ohne weitere Reinigung auf ihre Hemmwirkung gegenüber Trypsin und Kallikrein; zum Vergleich ebenfalls Ampullen - Trasylol^R:

Trasylol^R:

ImU (Trypsin-BAPA) : ImU (Kallikrein-BAEE) = 1 : 42

"hochmol. Nieren-Trasylol":

ImU (Trypsin-BAPA) : ImU (Kallikrein-BAEE) = 1 : 28

"niedermol. Nieren-Trasylol":

ImU (Trypsin-BAPA) : ImU (Kallikrein-BAEE) = 1 : 30

Die Inhibitoren der hochmolekularen und der niedermolekularen Fraktion stimmen innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmungsmethoden untereinander und verglichen mit Trasylol^R im Hemmverhältnis von Trypsin : Kallikrein überein.

5. Die Plasminhemmung

e) Im Astrup - Plattentest

Da die Plasminhemmung der hochmolekularen, keiner weiteren Reinigung unterworfenen Inhibitorfraktion wegen der leichten Trübung der Lösung beim photometrischen BAEF-Test nicht bestimmt werden konnte, nahmen wir den Astrup - Plattentest zu Hilfe.

Die Astrup-Platten sind fibrinhaltige Agarplatten⁽⁴³⁾, in die kleine Löcher eingestantzt sind. In jedes Loch gab man 0,085 Novo-Einheiten Schweineplasmin (Novo). Dazu kamen jeweils 0,75 ImU der entsprechenden Inhibitorformen. Die Platten wurden dann 24 Stunden bei 37° C aufbewahrt. Es bildeten sich verschieden große Fibrinolyse-Höfe, deren Durchmesser ausgemessen wurden:

Plasmin	10,0 mm
Plasmin + Trasylo ^R	2,5 mm
Plasmin + hochmol. Inhibitorfraktion	12,0 mm
hochmol. Inhibitor- fraktion allein	keine Fibrinolyse

Die hochmolekulare Inhibitorfraktion hemmt im Gegensatz zum Ampullen-Trasylo^R in gleicher Konzentration (bez. auf ImU für Trypsin) Plasmin demnach nicht.

b) Im photometrischen BAEE-Plasmin-Hemmtest verhält sich der gereinigte (siehe C I, 4) Inhibitor der niedermolekularen Fraktion gleichartig wie Ampullen-Trasylo^R.

Um eventuelle Unterschiede in der Hemmung der Plasminvorstufen zu erfassen, wurden Ampullen-Trasylo^R, hochmolekulare enteweißte (siehe C I, 4) und hochmolekulare nicht enteweißte Inhibitorfraktion und niedermolekularer gereinigter Inhibitor im

c) visuellen Fibrinolysetest vergleichend untersucht. (Der Test ist unter C I, 3 beschrieben).

Um zu klären ob bereits Nierenhomogenat-Überstand von nicht behandelten Ratten eine Hemmung des Plasmin oder der Plasminaktivierung bewirkt, wurde der beim Ultrazentrifugieren gewonnene Überstand eines Rattennieren-Homogenats (wie bei C II, 1) dem visuellen Fibrinolysetest unterworfen.

Zusammengefaßt ergaben sich die in Tabelle 7 angegebenen Meßwerte:

(Tabelle 7: nächste Seite)

Der Inhibitor aus der hochmolekularen Fraktion, die aber mit Perchlorsäure behandelt wurde, nimmt das Plasmin und die Aktivierung des Plasmin in vergleichbarer Konzentration* wie Ampullen-Trasylo^R nicht. Im unenteweißten Zustand jedoch zeigt der Inhibitor der hochmolekularen

*(bezogen auf ImU für Trypsin)

Inhibitor	ImU	Lysiszeit
NaCl "Leerwert"		3'
Nierenhomogenat unenteiweißt		3'
Nierenhomogenat enteiweißt		3' 30"
Trasylol ^R	8	5' 30"
niedermol. Inhibitorfraktion gereinigt	8	5' 30"
hochmol. Inhibitorfraktion enteiweißt	8	3' 30"
hochmol. Inhibitorfraktion nicht enteiweißt	8	60'
"	3	20'
"	2	9'
"	1	6'

Tabelle 7

Fraktion eine sehr starke Hemmwirkung im visuellen Fibrinolysetest.

6. Inkubationsversuche mit niedermolekularem "Nieren - Trasylol" in Nierenhomogenat

Ein Nierenhomogenat (Herstellung siehe C II, 1) aus 4,2 g Nieren von unbehandelten Ratten wurde mit dem Inhibitor aus der (bei C II, 2 u. 3 durch Gelfiltration erhaltenen) niedermolekularen Inhibitorfraktion bei 37° C und pH 7,3 unter Rühren eine Stunde lang inkubiert.

Nach dem Ultrazentrifugieren trug man den Überstand auf eine mit Sephadex G-50 gefüllte Säule auf und beobachtete im Eluat wieder die hochmolekulare (MG bei 31 500) und die niedermolekulare (MG bei 5 500) Inhibitorfraktion:

niedermol. Inhibitor inkubiert (ImU)	nach Gelfiltration	
	niedermol. Fraktion (ImU)	hochmol. Fraktion (ImU)
1 200	840	280

Tabelle 8: Die Differenz zwischen der Summe von hoch- und niedermolekularer Fraktion und den zum Inkubieren eingesetzten 1200 ImU rührt daher, daß nach dem Ultrazentrifugieren nur noch 1120 ImU im Überstand, der zur Gelfiltration eingesetzt wurde, gefunden wurden.

Wenn dagegen Ampullen-Trasylol^R mit Nierenhomogenat von Ratten inkubiert wird, erscheint der Inhibitor bei der Gelfiltration im Eluat nur in einer Fraktion vom Molekulargewicht um 6000 wieder. Ein hochmolekular gebundenes Trasylol wird hier nicht gefunden⁽¹⁵⁾.

7. Das Verhältnis von hochmolekularer zu niedermolekularer Inhibitorfraktion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Der Versuch C II, 6 wurde unter Berücksichtigung verschiedener Inkubationszeiten wiederholt, und das Verhältnis von hochmolekularem zu niedermolekularem Inhibitor beobachtet:

Inkubationszeit	inkubierte ImE	Fraktion hochmol.	Fraktion niedermol	Verhältnis hoch-;niedermol : mol
3 min.	1400	100	1230	1 : 12,3
1 Std.	1200	280	840	1 : 3,0
4 Std.	1400	630	670	1 : 1,1
24 Std.	1200	75	1015	1 : 13,5

Tabelle 9: Die Differenz zwischen der Summe von hoch- und niedermolekularer Fraktion und den zum Inkubieren eingesetzten ImU rührt daher, daß nach dem Ultrazentrifugieren die eingesetzten ImU nicht mehr vollzählig im Überstand, der zur Gelfiltration kam, gefunden wurden.

Mit zunehmender Inkubationszeit des niedermolekularen Nieren-Trasylol in einem Nierenhomogenat nimmt die bei Sephadex-Gelfiltration gewonnene hochmolekulare Inhibitorfraktion bis zu einem Maximum bei 4 Std. zu, um dann wieder abzusinken und bei 24 Std. ein ähnliches Verhältnis von hochmolekularer zu niedermolekularer Inhibitor-

fraktion wie bei 3 min. zu erlangen. (Siehe Tabelle 9 und folgende Abbildung 7).

hochmol. : niedermol.

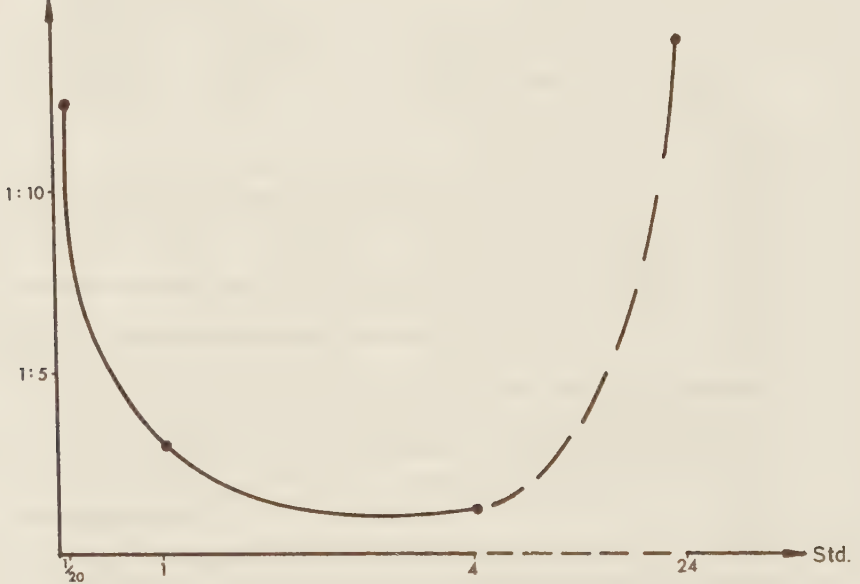


Abbildung 7: Ordinate: Verhältnis der hochmolekularen Inhibitorfraktion zur niedermolekularen Fraktion
Abszisse: Inkubationszeit des niedermolekularen Nieren-
Trasylool im Nierenhomogenat.

8. Die Aminosäurezusammensetzung des niedermolekularen Nieren-Trasylol

a) Vorbereitung zur Analyse

Das in den Versuchen C II, 2 u. 3 nach Gelfiltration in der niedermolekularen Fraktion gewonnene Trasylol wurde von allen störenden Begleitstoffen gereinigt. Dies geschah mit Hilfe eines wasserunlöslichen Trypsin-Harzes (H. Fritz et al., 7), ähnlich wie bei C III genau beschrieben ist. Dabei wurde statt im Säulen-Verfahren im Batch-Verfahren gearbeitet.

Nachdem das unlösliche Trypsinharz mit der Inhibitorlösung mehrere Stunden bei 0°C im Eisbad gerührt worden war, und man nach dem Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge keine Inhibitoraktivität mehr im Überstand fand, wurde der unlösliche Trypsin-Harz - Inhibitor - Komplex mehrere Male mit 0,2M Tra-Puffer, pH 7,8, von allen Begleitproteinen und Verunreinigungen freigewaschen, und der Inhibitor dann mit KCl/HCl-Puffer, pH 2,0, vom Harz desorbiert. Durch Dialyse (siehe C III, 4) wurden aus der inhibitorhaltigen Lösung noch die Salze entfernt.

b) Analyse

Das so gereinigte Nieren-Trasylol der niedermolekularen Fraktion mit dem unter C II, 2 bestimmten Molekulargewicht von 5 500 wurde nun 24 Stunden mit 6N HCl hydrolysiert und im Beckmann Aminosäureanalyser auf seine Aminosäurezusammensetzung untersucht:

gefundene Aminosäuren	niedermol. Nieren-Trasylol	Trasylol
Lys	4	4
Arg	5	6
Asp	5	5
Thr	3	3
Ser	1	1
Glu	3	3
Pro	4	4
Gly	6	6
Ala	5	6
Val	1	1
Meth	1	1
Ileu	2	2
Leu	2	2
Tyr	4	4
Phenylala	4	4
Cys 1/2	6	6

Die Aminosäurenanalyse des in den Nieren gespeicherten niedermolekularen Trasylol zeigt, daß zwei Aminosäuren, nämlich ein Alanin und ein Arginin fehlen, die im Trasylol-molekül die Carboxyl- bzw. Amino-endständigen Aminosäuren sind (siehe Abbildung 1). Zum Vergleich der Aminosäuren-zusammensetzung wurde das in Versuch C III gereinigte Trasylol herangezogen.

Zur Identifizierung der N-terminalen Aminosäure diente die Reaktion mit Dinitrofluorbenzol nach SANGER, bei der die N-terminale Gruppe als Dinitrophenylamino-säure bei der Hydrolyse des Peptids abgespalten und

chromatographisch identifiziert wird. In unserem Fall des Nieren-Trasylool würde nach der Abspaltung des Arginin die N-terminale Aminosäure Prolin sein (siehe Abb. 1), das aber nach der Dinitrophenylierung bei der Hydrolyse zerstört wird. Deshalb wurde zu seiner Bestimmung ein indirekter Weg über die Aminosäureanalyse beschritten, bei der die Aminosäurezusammensetzung des Restpeptids nach der Hydrolyse bestimmt wird.

Hochstrasser et al.⁽¹⁶⁾ fanden nun, daß in der Aminosäurezusammensetzung des niedermolekularen Nieren-Trasylool neben dem abgespaltenen Arginin nach der Dinitrophenylierung auch ein Prolin fehlt. Prolin ist demnach die N-terminale Aminosäure im Molekül des niedermolekularen Nieren-Trasylool.

D I S K U S S I O N

Irgendwo im Organismus wird das den Ratten injizierte Trasylol^R in dem Sinne verändert, daß die Carboxyl-endständige Aminosäure Alanin und das Amino-endständige Arginin abgespalten werden. Nur in diesem veränderten Zustand ist der Inhibitor in der Lage nur oder auch in der Niere zum Teil eine Verbindung mit einem höhermolekularen Stoff einzugehen, wobei sich so das Molekulargewicht von 31 500 ergibt. Das vollständige 58 Aminosäuren enthaltende Trasylol^R kann diesen Komplex nicht bilden (C II, 6). Das läßt darauf schließen, daß die Abspaltung der beiden Aminosäuren nicht in der Niere vollzogen wird, denn sonst müßte auch die hochmolekulare Verbindung des Trasylol in der Niere nachgewiesen werden können, wenn man Trasylol^R mit Nierenhomogenat von unbehandelten Tieren inkubiert (II 6). Dagegegenghalten könnte werden, daß beim Homogenisieren des Organs die Fähigkeit zur Abspaltung der Aminosäuren verlorenggeht, daß also vorhandene Carboxy- und Amino-peptidasen geschädigt werden, wodurch in vitro keine Veränderung des Trasylols und damit auch keine hochmolekulare Verbindung zustandekommen könnten.

Daß aber überhaupt diese Verbindung erst in vitro beim Homogenisieren zustandekomme⁽²⁹⁾, wird dadurch entkräftigt, daß mit zunehmender Verweildauer des Trasylol in den Nieren eine leichte Abnahme des an eine höhermolekulare Substanz gebundenen oder assoziierten Inhibitors zu be-

obachten ist, was ein Geschehen in vivo darstellt (II,3)

Nicht aber zurückzuführen auf diese Abnahme des hochmolekularen Komplexes ist der Anstieg des Verhältnisses von hochmolekularem zu niedermolekularem "Nieren-Trasylool" zu Gunsten der niedermolekularen Form mit zunehmender Verweildauer des Inhibitors in den Nieren. Dies ist vielmehr dadurch bedingt, daß im Laufe der Zeit nach der Injektion immer mehr niedermolekulares Trasylool in die Niere gelangt und so das Verhältnis zu seinem Vorteil verschiebt.

Die Frage, warum die niedermolekulare Inhibitorform dann keine weitere Verbindung mit dem hochmolekularen Träger eingeht, könnte dahingehend beantwortet werden, daß nur ein bestimmtes mögliches Maximum an gebundenem Trasylool erreicht werden kann (Verbrauch des hochmolekularen Begleitstoffes?), während darüber hinaus das Trasylool in der niedermolekularen Form vorliegt.

Bei der Inkubation des veränderten, niedermolekularen Nieren-Trasylool in einem Nierenhomogenat von unbehandelten Ratten konnte dagegen eine Zu- und eine darauffolgende Abnahme der hochmolekularen Inhibitorfraktion mit zunehmender Inkubationszeit beobachtet werden. Der "Abbau" des gebundenen Trasylool bedeutet dabei nur eine Spaltung des Komplexes von Trasylool und hochmolekularer Substanz, so daß die niedermolekulare Inhibitorfraktion in der gleichen Weise zunimmt wie die hochmolekulare abnimmt (II,7, Tab 9).

Dabei wurde das oben geforderte Maximum an hochmolekularem Nieren-Trasylool deutlich überschritten, was aber

durch die Auflösung aller Zellstrukturen in vitro beim Homogenisieren und einer damit verbundenen eventuellen Freisetzung von mehr komplexgebender Substanz erklärt werden könnte.

Bei der Bildung der hochmolekularen Trasylol-Verbindung im Inkubationsversuch (II,7) kann es sich um eine reine Zeitreaktion handeln. Die Vorgänge des Abbaus bedürfen noch einer genaueren Untersuchung.

Die Substanz, an die das Trasylol gebunden ist, könnte ein saures Protein oder Proteid vom Molekulargewicht um 25 000 sein.

Bei einer Isolierung dieser Substanz mit Hilfe von einem wasserunlöslichen Enzym-Harz könnte die Tatsache ausgenützt werden, daß bei einem pH-Wert von 4,3 der bei pH 7,3 vorliegende Komplex zwischen Trasylol und dem hochmolekularen Träger schon zu 50% gespalten ist (Tab. 6).

Das in den Nieren von Ratten gespeicherte und in seiner Aminosäurezusammensetzung veränderte, niedermolekulare Trasylol zeigt das gleiche Hemmverhalten gegenüber Plasmin, Trypsin und Kallikrein wie das Ampullen-Trasylol^R.

Ebenso gleichartig wie Trasylol^R verhält sich der Inhibitor aus der hochmolekularen Fraktion gegenüber Trypsin und Kallikrein.

In seinem Hemmverhalten gegenüber Plasmin ist jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen der hochmolekularen Trasylolfraktion und dem Ampullen-Trasylol zu beobachten:

Das hochmolekulare "Nieren-Trasylo1" vermag Plasmin nicht zu hemmen (II,5a), zeigt aber eine sehr starke Hemmung der Fibrinolyse im visuellen Fibrinolysetest, bei dem durch die Verwendung von Nativblut auch Plasminogen vorhanden ist, und die Aktivierung des Plasmin durch Streptokinase eingeleitet wird. Da das hochmolekulare "Nieren-Trasylo1" im Astrup-Plattentest das Plasmin allein nicht zu hemmen vermag, muß es also stark hemmend in die Vorgänge der Plasminaktivierung eingreifen (Tab. 7, Seite). Wenn es dagegen mit Perchlorsäure behandelt und von allen höhermolekularen Proteinen befreit ist, hemmt es, wie im unenteiweißten Zustand auch, das Plasmin nicht, hat aber jetzt seine hemmende Wirkung auf die Plasminaktivierung verloren (Tab. 7 u. zusammengefaßt in Tab. 10):

Inhibitor- form	Trypsin MG 24 000	Kallikrein MG ⁽⁸⁾ 33 000	Plasmin MG 108 000	Plasmin- aktivie- rung
Trasylo1 ^R	+	+	+	+
niedermol. verändertes "Nieren-Trasylo1"	+	+	+	+
hochmolekulares "Nieren-Trasylo1" <u>unenteiweißt</u>	+	+	-	+++
hochmolekulares "Nieren-Trasylo1" <u>enteiweißt</u>	+	nicht untersucht	-	-

Tab. 10: Hemmung = +, keine Hemmung = -, sehr starke Hemmung = +++

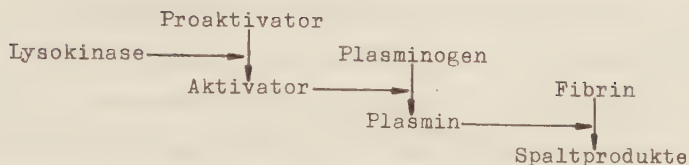
Nach dem Ultrazentrifugieren gewonnener Nierenhomogenat-Überstand von unbehandelten Tieren zeigt im Fibrinolysetest keine Verlängerung der Lysiszeit.

Es muß also das Trasylol in seiner Verbindung mit dem höhermolekularen Trägerstoff für die starke Hemmung der Vorgänge bei der Plasminaktivierung verantwortlich gemacht werden.

Die Gefahr einer Thrombenbildung in den Nieren von mit Trasylol behandelten Patienten ist im Hinblick darauf in den Vordergrund gerückt. Noch dazu muß man bedenken, daß 4 Stunden nach der Injektion von Trasylol bereits 90% der injizierten Inhibitormenge in den Nieren gespeichert sind. Das sind z.B. bei einer Dosis von 1,2 Mill. KIE ca. 1 Mill. KIE Trasylol, die sich in den Nieren befinden.⁽⁶⁾ Deshalb sollte nach Infusion höherer Inhibitor Dosen unbedingt die Nierenfunktion des Patienten mindestens 14 Tage lang überwacht werden, da infolge der Anreicherung des Inhibitors in den Nieren ein schädigender Einfluß nicht von vorneherein ausgeschlossen werden kann⁽⁶⁾.

An welchem Punkt der Plasminaktivierung nun das hochmolekulare "Nieren-Trasylol" eingreift, muß noch untersucht werden. In Frage käme:

1. eine Hemmung der Lysokinase (Streptokinase), die den Proaktivator in den Aktivator umwandelt,
2. eine Hemmung des Aktivators, der aus Plasminogen Plasmin freisetzt (siehe Schema).



Auf eine weitere, zusätzliche Veränderung des niedermolekularen "Nieren-Trasylol" bei der Bildung des hochmolekularen Komplexes ließe schließen, daß das vom Träger befreite Trasylol Plasmin nicht mehr hemmt, während das niedermolekulare, veränderte "Nieren-Trasylol" eine Hemmung von Plasmin bewirkt.

Die Tatsache, daß das hochmolekulare "Nieren-Trasylol" im unentweißten und entweißten Zustand Plasmin nicht hemmt, jedoch seine Inhibitorwirkung für Trypsin und Kallikrein beibehalten hat, legt die Vermutung nahe, daß im Trasylol-Molekül das aktive Zentrum für Plasmin nicht aus den selben reaktiven Gruppen besteht wie für Trypsin und Kallikrein.

Für das niedermolekulare "Nieren-Trasylol" wurde bei der Sephadex-Gelfiltration ein Molekulargewicht von 5 500 gefunden. Durch die Abspaltung der beiden Aminosäuren müßte sich aber ein Molekulargewicht von ca. 6 200 ergeben. Da nun bei der Gelfiltration die Molekülgrößen verglichen werden, kann eine Konformationsänderung des Moleküls ein niedrigeres oder höheres Molekulargewicht vortauschen.

Während die Abspaltung des Alanins den Ladungscharakter des Trasylolmoleküls praktisch nicht verändert, wird

durch die Entfernung der stark basischen Guanidingruppe (Argininabspaltung) die Basizität des Trasylolmoleküls deutlich verringert, der isoelektrische Punkt also in Richtung Neutralpunkt verschoben. Dies dürfte zu einer Schrumpfung des Trasylolmoleküls durch die Abnahme der positiven Überschußladung in neutraler Lösung führen, womit sich das deutlich verkleinerte Molekülvolumen bei der Sephadex-Gelfiltration erklären läßt.

Aus Versuch C II, 1 geht hervor, daß der durch Ultrazentrifugation eines Ratten-Nierenhomogenats erhaltene Niederschlag imstande ist den Inhibitor Trasylol^R bei einer Inkubationstemperatur von 0° C aus seiner Lösung zu "adsorbieren". Dieser Befund könnte darauf hinweisen, daß der Inhibitor eventuell an ein sedimentierbares Membranenzym gebunden wird, das unter den Bedingungen in vitro bei 37° C bereits denaturiert.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. In einem Nierenhomogenat von Ratten kann kein enzymatischer Abbau des zugesetzten Trasylol^R nachgewiesen werden. Der Inhibitor behält seine volle biologische Aktivität (gemessen an der Trypsin-hemmung).
2. Das den Ratten injizierte Trasylol wird im Organismus in dem Sinne verändert, daß die beiden Carboxyl- und Amino-endständigen Aminosäuren Alanin und Arginin abgespalten werden.
3. Nur in diesem veränderten Zustand wird das Trasylol in der Niere zum Teil an eine höhermolekulare Substanz gebunden oder assoziiert, wobei sich bei Sephadex-Gelfiltration ein Molekulargewicht von 31 500 ergibt. Daneben liegt das Trasylol zum größeren Teil in (wie bei 2. beschrieben) veränderter, niedermolekularer Form vor.

Unverändertes Ampullen-Trasylol^R mit Nierenhomogenat inkubiert, bildet keine hochmolekulare Inhibitorfraktion.

4. Mit zunehmender Verweildauer des Trasylol in den Nieren verschiebt sich das Verhältnis von hochmolekular gebundenem zu niedermolekularem Inhibitor zu Gunsten des niedermolekularen.
- Ebenso geschieht dies bei Verschiebung des pH-Wertes zur sauren Seite. Bei pH 4,3 ist die Hälfte des bei

pH 7,3 vorliegenden Komplexes von Trasylol und hochmolekularem "Träger-Stoff" gespalten.

5. Bei der Inkubation von niedermolekularem Trasylol - isoliert aus den Nieren von Ratten, denen Trasylol injiziert worden war - in Nierenhomogenat von unbehandelten Tieren ergibt sich folgendes: Der Inhibitor liegt wieder in der hochmolekularen, gebundenen und daneben in der niedermolekularen Form vor. Mit zunehmender Inkubationszeit wird zuerst ein Aufbau der hochmolekularen Verbindung bis 4 Std. auf Kosten des niedermolekularen Trasylol und dann eine anschließende Spaltung der Verbindung beobachtet.
6. Das in seiner Aminosäurezusammensetzung veränderte niedermolekulare Nieren-Trasylol besitzt die gleiche Hemmwirkung gegenüber Plasmin, Kallikrein und Trypsin wie das Ampullen-Trasylol^R.
7. Zum Unterschied dazu hemmt der Inhibitor der hochmolekularen Fraktion (MG bei 31 500) das Plasmin nicht, greift aber stark hemmend in die Vorgänge der Plasminaktivierung ein. Wird er aber durch Behandlung mit 6% iger Perchlorsäure von höhermolekularen Proteinen befreit, dann findet man weder eine Hemmung von Plasmin noch von der Plasminaktivierung. Die Trypsin-Hemmung bleibt jedoch erhalten.
8. Nierenhomogenat von unbehandelten Tieren allein vermag Plasmin oder die Aktivierung des Plasmin nicht zu hemmen.

- 28 Meyer,A. Neue Aspekte der Trasylol Therapie I, 142 (1966)
- 29 Reichenbach,K. Dissertationsschrift, Med. Fak. München (1967)
- 30 Schmutzler,R. VIII Hamb. Symp. ü. Blutgerinnung, 157-165 (1966)
- 31 Schult,H. Dissertation in Vorbereitung, Univ. München
- 32 Schultis,K., W.Rick Vortrag bei der Tagung der Deutschen Gesellschaft f. Innere Medizin (1964)
- 33 Trautschold,I., E.Werle, G.Zickgraf-Rüdel Arzneimittel-Forschung 16, 1507-1515 (1966)
- 34 Trautschold,I., E.Werle Z.f. physiol. Chemie 325, 48 (1961)
- 35 Trautschold,I. Habilitationsschrift, Univ. München (1965)
- 36 Trautschold,I., E.Werle Hoppe Seyler's Z. physiol. Chemie 325, 48 (1961)
- 37 Werle,E., U.Berek Biochem. Z. 320, 136 (1950)
- 38 Werle,E., L.Meier, E.Ringelmann Naturwiss. 39, 328 (1952)
- 39 Werle,E. Z. physiol. Chemie 338, 228 (1964)
- 40 Werle,E., I.Trautschold, H.Fritz Neue Aspekte der Trasylol Therapie I, 14 (1966)
- 41 Werle,E., I.Trautschold Münch. Med. Wschr. 103, 773 (1961)
- 42 Werle,E. Dtsch. Med. Wschr. 35, 1573 (1967)
- 43 Astrup,R., S.Müllertz Arch. Bioch. Biophys. 40, 346 (1952)

Die folgende Tabelle zeigt die Aminosäurezusammensetzung der Kallikrein-Trypsin-Inhibitoren aus S c h a f - l u n g e und aus R i n d e r l u n g e (Trasylol^R). Mol Aminosäure/mol Inhibitor.

gefundene Aminosäuren	Schafflunge ⁽⁸⁾	Rinderlunge ⁽¹¹⁾
Lys	2	4
Arg	4	2
Asp	6	5
Thr	2	3
Ser	3	1
Glu	4	2
Pro	2	4
Gly	5	6
Ala	3	6
Cys 1, 2	2	5
* Val	1	1
* Met	1	1
* Ileu	2	2
* Leu	2	2
* Tyr	4	4
* Phe	4	4

- * Die hydrophoben Aminosäuren, die die Tertiärstruktur des Inhibitorsmoleküls verursachen (stabilisieren) sind bei beiden Inhibitoren in der gleichen Anzahl vorhanden.

Abb.8 (rechte Seite): Elektrophorese des Inhibitors aus Schafflunge und Rinderlunge (Trasylol^R).Borat-Puffer pH 8 0,05M. Laufzeit: 1 Stunde bei 200V.

III. Verteilung eines neuen, Trasylol-ähnlichen Proteinaseinhibitors nach intravenöser Injektion im Organismus der Ratte; im Vergleich dazu die Verteilung des Trasylol^R.

1. Chemische Eigenschaften des Inhibitors

Der in unserem Arbeitskreis (Schramm u. Greif, 8) aus Schaflunge isolierte polyvalente Proteinaseinhibitor besitzt ähnliche chemische Eigenschaften wie das Trasylol. Er hemmt die proteolytischen Enzyme

Kallikrein (Substrat: EAEE),

Plasmin (Substrat: EAEE),

Trypsin (Substrat: BAPA) und

Chymotrypsin (Substrat: SUPHEPA).

Mit diesen Enzymen bildet der Inhibitor in physiologischen pH-Bereichen einen Komplex im jeweiligen Molverhältnis 1:1. Die Komplexbildung ist in allen Fällen reversibel; beim Ansäuern verschiebt sich das Gleichgewicht wieder zu Gunsten der Einzelkomponenten.

Der Inhibitor aus Schaflunge ist ein deutlich weniger basisches Polypeptid als Trasylol (vgl. Elektrophorese, Abb. 8). Er ist aus 56 Aminosäuren zusammengesetzt (Tab. linke Seite), woraus sich ein Molekulargewicht von 6314 errechnet.

Abbildung 8

Tabelle 11: Verteilung des Trypsin-Kallikrein Inhibitors aus Schaflunge nach i.v. Injektion auf Serum, Leber und Nieren der Ratte. Zum Vergleich ist in Klammern die Verteilung des Trypsin-Kallikrein Inhibitors Trasylol^R angegeben (nach Kemkes,6).

- 51 -

Ratten mit einem Gewicht zwischen 285 und 315 g wurden in die Schwanzvene jeweils 3000 ImU für Trypsin der Inhibitoren injiziert (d.s. 10 000 ImU für Trypsin pro kg Körpergewicht oder 18 000 KIE/kg). Nach den angegebenen Zeiten wurden die Tiere entblutet und ihre Organe exstirpiert. Für jeden der angegebenen Zeitpunkte wurden die Ergebnisse von jeweils mindestens 3 Versuchstieren gemittelt; die Abweichung für das Einzeltier vom Mittelwert liegt zwischen 1 u. 2%. Die Herstellung der zur Messung der Trypsininhibition verwendeten Extrakte ist unter C I,4 beschrieben.

Zeit nach Injektion	Nach Injektion von 3000 ImU für Trypsin gefundene Inhibitormenge in				
	[ImU] für Trypsin		Serum + Nieren + Leber		[%]
	Serum	Nieren	Leber	bez. auf die inj. Inhib.menge=100%	
3 Min.	883 (612)	430 (454)	91 (96)	1404 (1162)	47 (39)
15 Min.	303 (245)	755 (690)	45 (101)	1103 (1037)	37 (35)
30 Min.	204 (128)	785 (841)	33 (121)	1022 (1091)	34 (36)
1 Std.	137 (55)	842 (1786)	24 (144)	1003 (1985)	33 (66)
4 Std.	77 (16)	1248 (2386)	38 (178)	1363 (2599)	45 (87)
24 Std.	45 (0)	683 (2000)	98 (210)	826 (2210)	28 (74)

Tabelle 11

2. Verteilung des Inhibitors nach i.v. Injektion in verschiedenen Organen der Ratte

Mit den oben angegebenen Arbeits- und Testmethoden ermittelten wir für die Organe Nieren und Leber und für das Serum die in den Tabellen 11 und 12 zusammengestellten Ergebnisse:

Die Werte für den Inhibitorgehalt im Pankreas sind nicht aufgeführt, weil in diesem Organ in allen Fällen kein injizierter Inhibitor gefunden wurde. Nur der organ-eigene Trypsin-Inhibitor wurde in den Pankreashomogenaten nachgewiesen: Die Organ-Leerwerte für das Pankreas (unter-sucht an 11 unbehandelten Ratten und berechnet unter Be-rücksichtigung der Organgewichte der bei den Injektionen verwendeten Tiere) schwankten zwischen 26 und 58 ImU für Trypsin pro Organ. Die Ergebnisse bei den behandelten Tieren schwankten zwischen 39 und 62 ImU pro Organ.

Zeit nach Injektion	[%]		
	bez. auf die injiz. Inhibitormenge = 100%		
	Serum	Nieren	Leber
3 Min.	30 (22)	14 (15)	3,2 (1,6)
15 Min.	10 (8)	25 (23)	1,6 (3,4)
30 Min.	7 (4,3)	26 (28)	1,1 (4,0)
1 Std.	5 (1,1)	28 (60)	0,8 (5,0)
4 Std.	3 (0,5)	41 (80)	1,3 (6,0)
24 Std.	1,5(0)	23 (67)	3,3 (7,0)

Tabelle 12: Prozentuale Verteilung des Inhibitors berech-net aus den Werten von Tabelle 11. In Klammern ist die Verteilung des Trypsin-Kallikrein Inhibitors Trasylol^R an-gegeben.

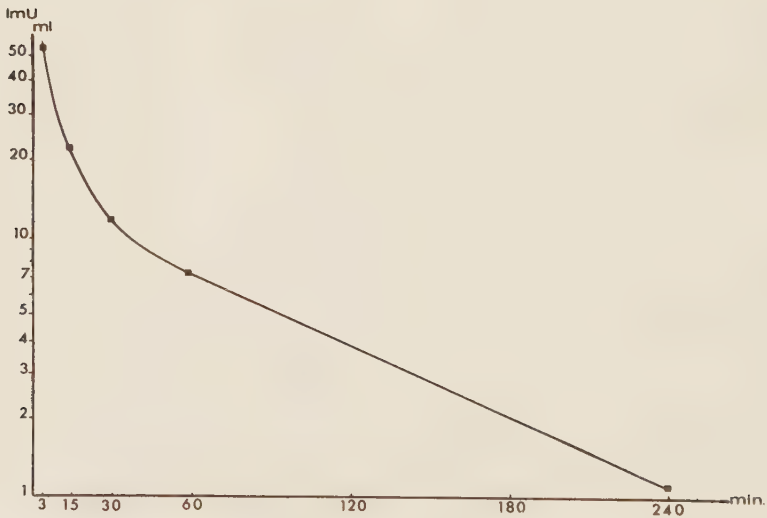


Abbildung 9a: Konzentration des Trypsin-Kallikrein Inhibitors Trasylole^R im Serum zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion. Ordinate: Inhibitorgehalt (ImU für Trypsin) pro ml Serum. Abszisse: Zeit nach Injektion. (nach Kemkes, 6)

Die Konzentration des Inhibitors im Blut fällt rasch ab. Trotzdem ist der Inhibitorgehalt zu den verschiedenen Zeiten höher als der nach i.v. Injektion von gleichen Mengen Trasylol^R. Bereits 3 Minuten nach Injektion von 3000 ImU pro Ratte sind nur noch 30% (Trasylol: 22%) des injizierten Inhibitors im Blut zu finden, 15 Minuten nach Injektion 10% (Trasylol: 8%) und 30 Minuten danach noch 7% gegenüber ca. 4% nach Trasylol-Applikation. Dies drückt sich auch in der Halbwertszeit des Inhibitors aus Schaflunge aus: Sie beträgt ca. 240 Minuten, wie sich aus Abbildung 9 errechnen ließ. Für das Trasylol^R dagegen werden nur ca. 70 Minuten als Halbwertszeit angegeben^(2,6).

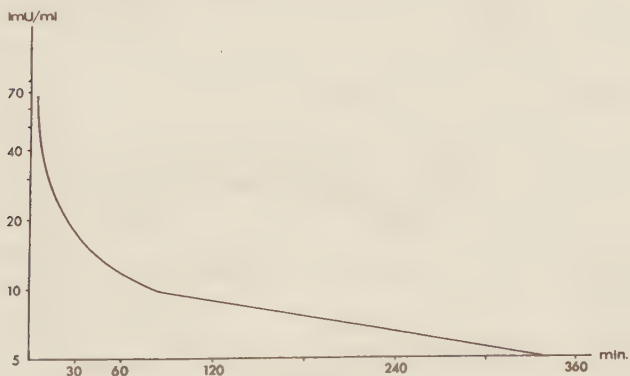
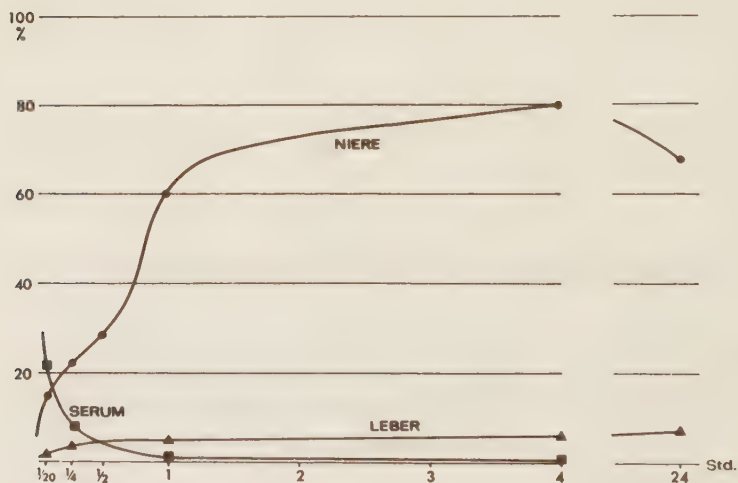


Abbildung 9: Konzentration des Inhibitors aus Schaflunge im Serum zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion. Ordinate: Inhibitorgehalt (ImU für Trypsin) pro ml Serum. Abszisse: Zeit nach Injektion.

Abbildung 10: Prozentuale Verteilung des Trypsin-Kallikrein Inhibitors Trasylol^R in Nieren, Leber und Serum der Ratte, bezogen auf die insgesamt injizierte Inhibitormenge (3000 ImU für Trypsin pro Ratte) = 100%. Ordinate: Inhibitormenge in %, Abszisse: Zeitpunkte nach der Injektion des Trasylol^R (Werte nach Kemkes,6).



Dem raschen Abfall im Blut folgt ein zeitlich verzögerter Anstieg der Inhibitorkonzentration in den Nieren bis 30 Minuten nach der Injektion, der in der Größenordnung dem Inhibitoranstieg nach Trasylol-Injektion gleichzusetzen ist. Während aber der Trasylolgehalt in den Nieren bis 4 Stunden weiter auf 80% der insgesamt injizierten Inhibitormenge zunimmt, ändert sich der Inhibitorgehalt nach Injektion des Trypsin-Kallikrein Inhibitors aus Schaflunge mit der Zeit nur noch wenig. Er erreicht nach 4 Stunden höchstens ca. 40% und nimmt nach 24 Stunden wieder auf 23% ab, denn im 12-Stunden-Harn erscheinen bereits 45-60% der insgesamt injizierten Inhibitormenge in biologisch aktiver Form (BAPA-Trypsinhemmttest); im 24-Stunden-Harn 50-65% und nach 48 Stunden nur um ca. 5% mehr.

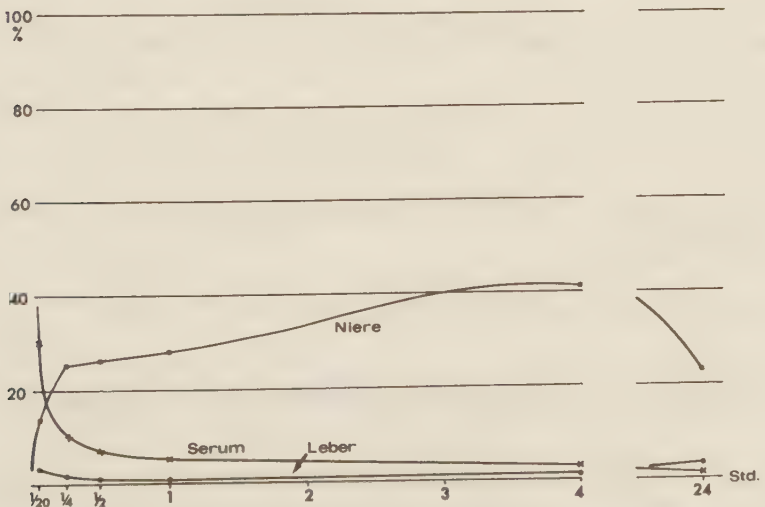
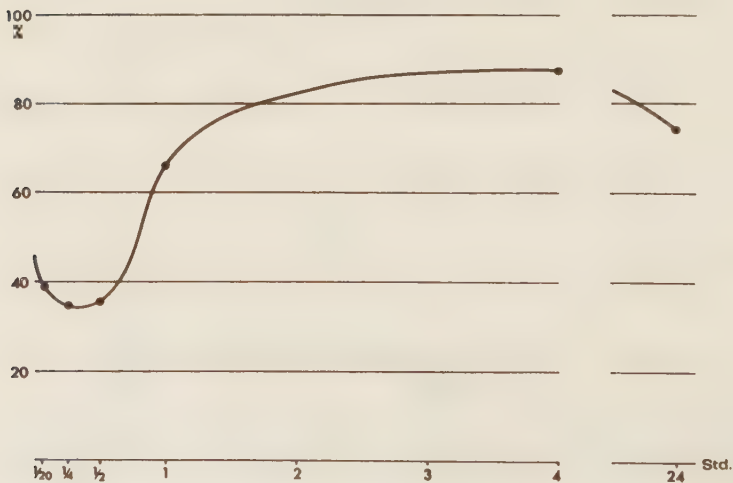


Abbildung 11: Prozentuale Verteilung des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Schaflunge in Nieren, Leber und Serum der Ratte, bezogen auf die insgesamt injizierte Inhibitormenge = 100%. Ordinate: Inhibitormenge in %, Abszisse: Zeit nach Injektion

Abbildung 12: Zu verschiedenen Zeitpunkten in Nieren+ Serum + Leber wiedergefundene Trasylolmenge, bezogen auf die insgesamt injizierte Menge des Trypsin-Kallikrein Inhibitors Trasylol^R (3000 ImU für Trypsin pro Ratte) = 100%. Ordinate: Inhibitormenge in %, Abszisse: Zeit nach Injektion des Trasylol^R. (Werte nach Kemkes,6).



In dem Zeitraum, der nach der Elimination des Inhibitors aus dem Blut bis zur Aufnahme in den Nieren und darauffolgende Ausscheidung mit dem Harn verstreicht, ist kein auffallender Anstieg der Inhibitorkonzentration in der Leber festzustellen. Die in diesem Organ nachweisbare Inhibitormenge übersteigt zu keinem der angegebenen Zeitpunkte 4% der insgesamt injizierten Inhibitormenge (siehe Tab. 12 und Abb. 11).

Im Pankreas ist die Inhibitorkonzentration in keinem der Fälle höher als die des organeigenen Trypsin-Inhibitors ("Organ-Leerwert").

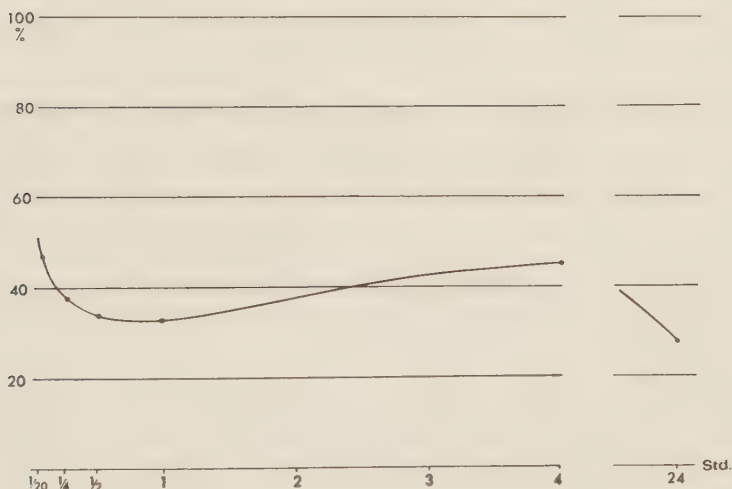


Abbildung 13: Zu verschiedenen Zeitpunkten in Nieren + Serum + Leber wiedergefundene Inhibitormenge, bezogen auf die insgesamt injizierte Menge an Inhibitor aus Schaflunge (3000 ImU für Trypsin pro Ratte) = 100%. Ordinate: Inhibitormenge in %, Abszisse: Zeit nach Injektion.

Der zu den verschiedenen Zeitpunkten in Nieren, Serum und Leber zusammen wiedergefundene Anteil der insgesamt injizierten Inhibitormenge ist in den Abbildungen 12 und 13 graphisch dargestellt:

Der starke Anstieg der "Trasylol-Kurve" nach einer halben Stunde post injektionem ist allein auf die in den Nieren gespeicherte Inhibitormenge zurückzuführen (siehe Tab. 11 und Abb. 10).

Der flachere Verlauf der Kurve für den Inhibitor aus Schaflunge kommt durch die weit geringere Anhäufung des Inhibitors in den Nieren zustande (siehe Tab. 11 und Abb. 11), was wiederum durch die Ausscheidung des Inhibitors in den Harn (siehe oben) bedingt ist.

In einem weiteren Versuch wurde das Hemmverhältnis von Rattennierenextrakten gegenüber Trypsin (Substrat: BAPA) und Kallikrein (Substrat: BAFE) 4 Stunden nach i.v. Injektion des Inhibitors aus Schaflunge bestimmt. Es entsprach innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmungsmethoden dem des injizierten Präparates.

D I S K U S S I O N

Die verwendete Methode zur Bestimmung des Inhibitor-
gehaltes der einzelnen Organextrakte, der BAPA-Trypsin-
hemmtest, ist die zur Zeit empfindlichste und genaueste
Methode zur Erfassung von Trypsinhemmstoffen⁽¹⁰⁾.

Die Untersuchungen über den Inhibitorgehalt im Serum
und in den einzelnen Organen der Ratte in unterschiedlichen
Zeitabständen nach der Injektion des Trypsin-Kallikrein
Inhibitors aus S c h a f l u n g e ergeben wesentliche
Aufschlüsse über das Schicksal dieses Inhibitors im Orga-
nismus. Der Vergleich mit der Verteilung des Trypsin-Kalli-
krein Inhibitors Trasylol^R aus R i n d e r l u n g e und
den spezifischen Trypsininhibitoren aus P a n k r e a s
von S c h w e i n und S c h a f l a k t genauere Aussagen
über eventuelle Gründe der unterschiedlichen Verteilung im
Organismus zu.

Nach intravenöser Gabe des Inhibitors aus Schaflunge
beobachtet man zunächst ein Abdiffundieren des Hemmstoffs
aus dem Blut in die extravaskuläre Flüssigkeit, bis sich
nach ca. 60 Minuten ein Verteilungsgleichgewicht zwischen
Blut und Gewebe einstellt, wie sich in Abbildung 9 aus dem
Übergang der Kurve in die Gerade ablesen läßt. Die aus der
Steilheit der Eliminationsgeraden berechnete Halbwertszeit
beträgt ca. 240 Minuten. Deshalb ist auch 24 Stunden nach
der Injektion noch Inhibitor (3,8 ImU/ml oder 7,0 KIE/ml)

im Serum nachweisbar. Dagegen findet sich schon 5 Stunden nach der Injektion von Trasylol^R kein Inhibitor mehr im Blut^(2,5,6,9). Der Trasylolspiegel im Serum sinkt also wesentlich schneller ab, was durch eine Halbwertszeit von ca. 70 Minuten zum Ausdruck kommt^(2,5).

Parallel zum Abfall der Inhibitorkonzentration im Serum geht ein Anstieg in den Nieren einher, sodaß 30 Minuten nach der Injektion 26% der gesamten injizierten Inhibitormenge und 4 Stunden danach der höchste Wert, nämlich 41% in beiden Organen nachzuweisen ist. Anschließend fällt der Inhibitorgehalt in den Nieren wieder ab, denn im 12-Stunden-Harn erscheinen bereits ca. 50% der injizierten Menge in biologisch aktiver Form (BAPA-Trypsinhemmtest). Im 24-Stunden- und 48-Stunden-Harn ist noch eine Zunahme des Inhibitorgehaltes auf 60% bzw. 68% zu beobachten bei einer gleichzeitigen weiteren Abnahme der Konzentration in den Nieren. Es ist daher anzunehmen, daß der gesamte injizierte Inhibitor aus Schaflunge von den Nieren in biologisch aktiver Form mit dem Harn ausgeschieden wird.

Der Unterschied zur Verteilung des Trasylol^R ist besonders 1 Stunde nach der Injektion auffallend: Bis 30 Minuten steigen nämlich in den Nieren die Inhibitorkonzentrationen von Trasylol bzw. Inhibitor aus Schaflunge in gleichem Maße an; nach 1 Stunde befinden sich jedoch in den Nieren bereits 60% des injizierten Trasylol^R gegenüber nur 28% des applizierten Inhibitors aus Schaflunge, also die doppelte Menge an Trasylol. 4 Stunden nach der Injektion

ist das Verhältnis das gleiche. Im 24-Stunden-Harn von mit Trasylol^R behandelten Tieren wurden höchstens 3% der applizierten Dosis gefunden (eigene Untersuchung).

Dieser Befund läßt die Aussage zu, daß die Ausscheidung des Inhibitors aus Schaflunge bereits 30 Minuten nach der Injektion beginnt, während der Trypsin-Kallikrein Inhibitor Trasylol^R in den Nieren gespeichert und proteolytisch abgebaut oder inaktiviert wird^(2,3,5).

Es ist sowohl eine spezifische Bindung des Trasylol an ein in den Nieren fixiertes Enzym als auch eine unspezifische Bindung an saure Mucopolysaccharide oder Nukleinsäuren denkbar. Gegen eine spezifische Bindung spricht, daß der Inhibitor aus Schaflunge, der ja das gleiche Hemmspektrum wie das Trasylol besitzt, die Nieren passieren kann und relativ rasch in aktiver Form im Harn erscheint. Ebenfalls von den Nieren in den Harn ausgeschieden werden die spezifischen Trypsininhibitoren aus Pankreas von Schwein^(4,7) und Schaf^(6,8). Nach der Injektion dieser Inhibitoren erscheinen im 24-Stunden-Harn schon ca. 40% bzw. über 50% in biologisch aktiver Form. In den Nieren sind im höchsten Fall nur 9% bzw. 14% der gesamten injizierten Inhibitor-menge nachzuweisen. Ein grundlegender Unterschied zwischen den genannten Inhibitoren aus Schaflunge, Schweine- und Schafpankreas und Trasylol^R besteht in der höheren Basizität des Trasylol^R gegenüber den anderen Inhibitoren, deren isoelektrische Punkte wesentlich niedriger liegen (unter 8).

Es könnte also durchaus die elektrochemische Ladung des Inhibitor-moleküls für die Speicherung in den Nieren bzw. für die Passage der Nierenfilter verantwortlich gemacht werden. Es ist nämlich auffallend, daß mit der Abnahme der Basizität des Inhibitor-moleküls auch die in den Nieren maximal gespeicherte Inhibitor-menge abnimmt:

in Pfeilrichtung abnehmende Basizität der Inhibitoren		in den Nieren maximal gespeicherte Inhibitor-menge % bez. auf die insgesamt injiz. Inhibitor-menge	
Inhibitoren aus			
	Rinderlunge (Trasylo ^R)	80%	
	Schaf-lunge	41%	
	Schaf-pankreas	14%	
	Schwein-pankreas	9%	

Bei Erkrankungen, die durch die Fermente des Kinin-Gerinnungs- und Lysissystems verursacht werden und bei denen das Trasylo^R therapeutisch eingesetzt wird, würde der Proteinaseinhibitor aus Schaf-lunge wegen seines umfassenden Hemmspektrums denselben Anwendungsbereich umschließen. Zwei wesentliche Vorteile sind allerdings darin zu sehen, daß erstens nach der Injektion des Inhibitors aus Schaf-lunge ein über längere Zeit höherer Inhibitorspiegel im Blut aufrechterhalten wird als nach Verabreichung des Trasylo^R, und zweitens der Inhibitor im Gegensatz zum Trasylo^R

zum großen Teil in kurzer Zeit (12 Stunden) über die Nieren in den Harn ausgeschieden wird. Diese günstig zu bewertende Eigenschaft des Inhibitors mindert natürlich die Gefahr einer Nierenthrombose, die eventuell bei der Anwendung des Trasylol^R durch dessen Speicherung in den Nieren gegeben ist.

Im Ganzen gesehen würde, soweit man es aus diesen Untersuchungen folgern kann, die Verwendung des Proteinase-inhibitors aus Schaflunge in der Therapie gegenüber der Anwendung des Trasylol einen Fortschritt bedeuten.

Z U S A M M E N F A S S U N G

In unserem Arbeitskreis (Schramm u. Greif, 8) wurde ein Trypsin-Kallikrein Inhibitor aus Schaflunge isoliert. Seine chemischen Eigenschaften sind denen des Trasylol^R ähnlich; er ist aber ein deutlich weniger basisches Polypeptid als der Trypsin-Kallikrein Inhibitor Trasylol^R.

Es wurde seine Verteilung nach intravenöser Injektion im Organismus der Ratte untersucht:

1. Nach i.v. Injektion von 10 000 ImU für Trypsin pro kg Körpergewicht beträgt die Zeit bis zur Einstellung eines Verteilungsgleichgewichtes etwa 60 Minuten (Trasylol: 30 Minuten, 2). Danach fällt die Inhibitorkonzentration im Serum mit einer Halbwertszeit von ca. 240 Minuten ab (Trasylol: ca. 70 Minuten, 2,6).
2. Damit geht ein Anstieg der Inhibitorkonzentration in den Nieren bis 4 Stunden post injektionem einher, der aber nie 40% der injizierten Inhibitormenge übersteigt (Trasylol: 80%, 6). Nach 12 Stunden werden bereits 45-60% der gesamten injizierten Inhibitormenge in biologisch aktiver Form mit dem Harn ausgeschieden (Trasylol: ca. 3% im 24-Stunden-Harn bei gleicher Injektionsdosis).
3. Zu keinem der angegebenen Zeitpunkte übersteigt die in der Leber nachweisbare Inhibitormenge 4% der gesamten injizierten. Im Pankreas liegen die nach Injektion gefundenen Inhibitorkonzentrationen im Bereich der Streuwerte für den pankreaseigenen Trypsin-Inhibitor.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1 Anderer, E. Z. für Naturforschung 20b,
462, (1965)
- 2 Aubagen, J. Dissertation, Med. Akad.
Düsseldorf (1964)
- 3 Fritz, H. Habilitationsschrift, Univ.
München (1968)
- 4 Fritz H., I. Trautschold,
G. Hartwich, E. Werle Fed. europ. Biochem. Soc. II
Meeting, Wien (1965)
- 5 Kaller, H. Naunyn-Schmiedebergs Arch.
exp. Patn., Pharm. 246, 92,
(1963)
- 6 Kemkes, F. H. Dissertation, Med. Fak. Mün-
chen (1969)
- 7 Oppitz, H. Dissertation, Med. Fak. Mün-
chen (1969)
- 8 Schramm, W., B. Greif Dissertation in Vorbereitung
Med. Fak. München
- 9 Trautschold, I., E. Werle Neue Aspekte d. Trasyolol Ther.
Schattauer-Verlag, S 3-19
(1966)
- 10 Fritz, H., I. Trautschold,
E. Werle in H. U. Bergmayer, Meth. der
enzymatischen Analyse, Verlag
Chemie, im Druck

IV. Feinreinigung von technischem Trasylol mit Hilfe eines wasserunlöslichen Trypsin - Harzes

Zur Herstellung von chemisch modifizierten Trasylol - Verbindungen^(3,4) wurde ein von allen störenden Begleitstoffen freies und möglichst reines Trasylol benötigt.

Die Reindarstellung von Proteinaseinhibitoren ist mit den üblichen Methoden der Proteinisolierung zeitraubend und aufwendig. Wir bedienten uns daher zur Feinreinigung des Trasylol eines von H. FRITZ et al. ausgearbeiteten einfachen und spezifischen Verfahrens zur Isolierung und Reinigung von Proteinaseinhibitoren⁽²⁾.

1. Prinzip:

Kopolymerisate aus Maleinsäureanhydrid und Äthylen reagieren mit Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein unter Bildung wasserunlöslicher, biologisch aktiver Enzym-Harze⁽⁵⁾. Das Enzym adsorbiert in Gegenwart geeigneter Pufferlösungen spezifisch den Proteinaseinhibitor. Nach dem Auswaschen aller Begleitsubstanzen wird der Inhibitor mit saurer Pufferlösung vom Harz wieder abgetrennt⁽²⁾.

2. Herstellung des Trypsin - Harzes:

In 300 - 350 ml 0,2M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 , wurden 5g Trypsin (Trypure novo) unter Rühren gelöst und dann im Eisbad gekühlt. Zu weiteren 280 ml Kaliumphosphatpuffer gab man unter Eiskühlung 2,5 g Maleinsäureanhydrid-Äthylen-Kopolymer (EMA-21) und homogenisierte die Suspension. Anschließend wurden sofort 25 ml

einer 0,1% igen Hexamethyldiaminlösung hinzugefügt und 3 Minuten unter Eiskühlung gerührt. Hierzu wurde nun die eingangs hergestellte eisgekühlte Trypsinlösung gegeben und die Mischung 12 Stunden im Kühlschrank mit dem Magnetrührer gerührt, wobei der pH-Wert der Lösung durch Zusatz von Puffer auf 7,5 gehalten wurde.

Die -Aminogruppen der Lysylreste, die sich an der Oberfläche des Proteinmoleküls befinden, reagieren dabei mit dem Maleinsäureanhydrid des Kopolymeren⁽⁵⁾.

Um alle Feststoffteilchen abzusetzen, wurde dann zweimal für 20 Minuten bei 6000 Umdrehungen pro min. zentrifugiert. In der überstehenden Lösung wurden von den 5 g eingesetzten Trypsin 0,77 g wiedergefunden, wodurch sich die an das wasserunlösliche Harz gebundene Menge an Trypsin mit 4,23 g berechnete.

Die Phosphationen wurden mit 0,1M NaCl + 0,1M Tris-Lösung aus dem Enzymharz-Niederschlag ausgewaschen. Abschließend wurde das Trypsin-Harz mit dem dreifachen Volumen von mehrmals aufgeschlemmten und 1 Stunde lang gequollenem Cellulosepulver (Cellex-XF-1) gemischt und in eine Säule (50x5 cm) mit Kühlmantel gegossen (Kühlung auf 0-4° C mit Hilfe des Ultra Kryomat TK-30, Lauda). Eine gute Kühlung der Säulen ist deshalb wichtig, weil die Substrat spaltende Aktivität der Enzyme bei 0-4° C praktisch zum Erliegen kommt, und dadurch die Enzyme stabiler sind, während die Komplexbildung mit dem Inhibitor noch unmeßbar rasch eintritt⁽²⁾.

Die Säule wurde dann mit 0,1M Tra-Puffer pH 7,8 , der außerdem 0,1M an NaCl und 0,01M an CaCl_2 war, gewaschen bis kein aktives Trypsin im Eluat mehr nachzuweisen war.

3. Reinigung:

Das in Tra-Puffer, pH 7,8 gelöste Trasylol wurde in Portionen zu je 150 mg auf drei Enzym-Harz Säulen aufgegeben, und das Harz kurz aufgerührt. Sobald sich das Harz wieder fest abgesetzt hatte, wurde die Säule mit ca. 3 l 0,1M Tra-Puffer + 0,1M NaCl pH 7,8 gewaschen. Der in Form des wasserunlöslichen Inhibitor - Trypsin-Harz Komplexes an die Säule fixierte Inhibitor wurde so von allen löslichen Begleitsubstanzen freigewaschen. Eine relativ hohe Salzkonzentration des Puffers (0,2M) verhindert eine Adsorption der in der Lösung eventuell vorhandenen Begleitproteine an die freien Carboxylgruppen des Kopolymeren⁽²⁾.

Anschließend wurde der Inhibitor-Trypsin Komplex mit 0,2M KCl/HCl-Puffer pH 2,0 gespalten und der Inhibitor damit aus der Säule eluiert. Je saurer die Elutionslösung ist, desto konzentrierter wird der Inhibitor im Eluat erhalten.

Von den insgesamt aufgetragenen 4200 mg Trasylol wurden 4000 mg im Fluat wiedergefunden. Das bedeutet eine Ausbeute von 95%.

Das den Inhibitor enthaltende Eluat wurde nach Zurückstellung des pH-Wertes auf 5 bis 6 im Rotationsverdampfer

stark eingeeengt, die ausgefallenen Salze abzentrifugiert und mit wenig Aqua bidest. gewaschen. Vom restlichen Salz wurde die Inhibitorlösung dann durch Dialyse befreit.

4. Dialyse:

Da das Trasylol wegen seiner geringen Molekülgröße dialysabel ist, verwendeten wir acetylierte Zellulosemembran-Schläuche nach der Methode von L. C. Craig⁽¹⁾. Die Poren der Membran werden durch die Acetylierung so verkleinert, daß das Inhibitormolekül sie nicht mehr passieren kann.

Hergestellt wurden eine 25% ige Lösung von Essigsäureanhydrid in trockenem, reinen Pyridin. Dann stellte man die entfalteten Zellulose-Schläuche (50 4,5 cm, Kalle Chemie, Wiesbaden) an beiden Enden geöffnet für 48 Stunden bei verschlossenem Gefäß in die Pyridinlösung. In einer 0,1N Essigsäurelösung wurden anschließend die Membrane von dem Pyridin 2 Stunden lang freigewaschen. Die Schläuche können so acetyliert und in 0,01N Essigsäure aufbewahrt mehrere Male zur Dialyse verwendet werden.

Das salzhaltige, eingeengte Trasylol-Eluat wurde nun in mehrere an einem Ende zugebundene Zellulosemembran-Schläuche so verteilt, daß noch genügend Raum zum osmotischen Volumenausgleich zur Verfügung stand. Dieser freie Raum wurde luftleer ausgestrichen, sodaß die Innenseiten des Schlauches aneinanderlagen. Dann band man auch das andere Ende fest zu, hing die Schläuche mit beiden Enden nach oben in einen 20 - 30 l fassenden Behälter

* Diese Werte sind infolge der Zerstörung des Cysteins während der Hydrolyse nicht vergleichbar.

gefundene Aminosäuren	ungereinigt	gereinigt	nach ANDERER ^(1a)
Lys	4,0	4,2	4
Arg	3,75	6,2	6
Asp	3,8	5,0	5
Thr	2,6	3,0	3
Ser	1,6	1,2	1
Glu	3,1	3,0	3
Pro	3,9	4,0	4
Gly	5,0	6,0	6
Ala	6,0	5,7	6
Cys 1/2	(2,2)*	(2,5)*	6
Val	1,2	0,95	1
Meth	0,7	0,98	1
Ileu	1,2	1,08	2
Leu	2,0	1,9	2
Tyr	2,9	3,5	4
Phe	2,9	3,7	4

Tabelle 13

und dialysierte bei Zimmertemperatur 50 bis 60 Stunden gegen destilliertes Wasser, das mit Essigsäure auf pH 4 eingestellt war. Es war darauf zu achten, daß das Wasser mit dem Magnetrührer ständig in Bewegung gehalten wurde, wobei es mehrere Male gewechselt werden mußte. Mit AgNO_3 wurde schließlich nachgewiesen, daß die Inhibitorlösung salzfrei war. Die Ausbeute betrug bei dieser Art der Dialyse 93 bis 97 Prozent. Das dialysierte, reine Trasylol wurde dann nochmals eingeeengt und anschließend lyophilisiert.

5. Spezifische Aktivität und Aminosäureanalyse

Die spezifische Aktivität (ImU pro μg Einwaage) des ungereinigten Ausgangspräparates betrug 2,9. Durch die Reinigung wurde die spezifische Aktivität um den Faktor 1,29 auf 3,75 angehoben, ein Wert, der dem theoretisch erreichbaren, maximalen Reinheitsgrad entspricht.

Die Aminosäureanalyse ergab für unser gereinigtes Präparat ebenfalls Werte, die denen entsprechen, die ANDERER 1965 bei der Sequenzaufklärung fand:

Tabelle 13 (linke Seite): Aminosäurezusammensetzung des technischen Trasylol und des gereinigten Präparates; daneben die in der Literatur^{1a} für das analysenreine Trasylol angegebenen Werte.

Mol Aminosäure/Mol Trasylol, 20 Stunden Hydrolyse mit 6N HCl, Analyse im Beckmann Analyser.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Herstellung eines wasserunlöslichen Trypsin-Harzes:
Kopolymerisate aus Maleinsäureanhydrid und Äthylen reagieren mit Trypsin unter Bildung wasserunlöslicher, biologisch aktiver Enzym-Harze.
2. Mit Hilfe dieses Trypsin-Harzes wurde ein technisches Trasylolpräparat weiter gereinigt. Das Trypsin-Harz bindet in Gegenwart von Pufferlösungen (pH 6-8) spezifisch den Inhibitor. Nach dem Auswaschen aller Begleitsubstanzen wurde der Inhibitor mit sauren Pufferlösungen (pH 2) vom Trypsin-Harz-Komplex wieder abgetrennt.
3. Die Inhibitorlösung wurde durch Dialyse mit Hilfe acetylierter Cellophanschlauche von den Salzen befreit. Die Acetylierung verkleinert die Porengröße der Cellophanmembran, sodaß das in käuflichen Dialyseschläuchen noch dialysierbare Trasylol die Membran nicht mehr passieren kann.
4. Die Aminosäurezusammensetzung des gereinigten Trasylol wurde bestimmt und mit der des Ausgangspräparates verglichen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- | | | |
|----|--|--|
| 1 | Craig, L.C. | Methods of Biochemical
Analysis, Vol X, 175, (1962) |
| 2 | Fritz, H., H. Schult,
M. Hutzl, M. Wiedemann,
E. Werle | Hoppe Seiler's Z. Phys.
Chemie <u>348</u> , 308-312, (1967) |
| 3 | Fritz, H., H. Schult | Veröffentlichung in Vorbe-
reitung |
| 4 | Kemkes, B.M. | Dissertation in Vorberei-
tung, Univ. München |
| 5 | Levin, Y., M. Pecht,
L. Goldstein, E. Kat-
chalski | Biochemistry <u>3</u> , 1905, (1964) |
| 1a | Anderer, E. | Z. für Naturforschung <u>20b</u> ,
462, (1965) |

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle danke ich für die
Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes.
Herrn Priv. Doz. Dr. H. Fritz bin ich für die
wissenschaftliche Anleitung und die zahlreichen
anregenden Diskussionen zu Dank verpflichtet.

LEBENS LAUF

Am 5. Juli 1944 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. Friedrich Meckl aus Amberg und seiner Ehefrau Irma, geborene Fichtner, in Bayreuth geboren. Mein Vater fiel noch im selben Jahr in Rumänien.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Schloßberg/Obb. und bestand im Juli 1964 die Reifeprüfung am Humanistischen Gymnasium in Rosenheim. Im Wintersemester 1964/65 begann ich an der Universität München das Medizinstudium. Dort legte ich am 22. Oktober 1965 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 18. April 1967 die ärztliche Vorprüfung ab. Das jetzige Wintersemester 1968/69 ist mein 9. Fachsemester.

